

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1040020209705
2. Titel van het project: Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs
3. Titel van de NTS: Het evalueren van dieeteffecten op darmgezondheid in varkens
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
10.2 .e. en g
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 17-04-2020
Aanvraag compleet: ja
In vergadering besproken: 20-04-2020 en 18-05-2020
Anderszins behandeld: n.v.t.
Termijnonderbreking(en): 24-04-2020 t/m 07-05-2020 en 27-05-2020 t/m 10-06-2020
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.
Aanpassing aanvraag: 07-05-2020 en 10-06-2020
Advies aan CCD: 12-06-2020
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager
n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager

Datum vragen: 24-04-2020

Datum antwoord: 07-05-2020

- a. De DEC heeft twijfels over de herhaalbaarheid, nawerkbaarheid en toetsbaarheid van het eerste deel van dit project. De sanitaire interventie door mest binnen te halen van andere bedrijven brengt verschillende risico's met zich mee. In de mest kunnen ziektekiemen zitten die het verloop van de proef beïnvloeden. Omdat de samenstelling van mest varieert tussen bedrijven en in de tijd is de vraag gerechtvaardigd hoe representatief en relevant de steekproef is en hoe een experiment herhaald kan worden onder dezelfde condities. Gezien deze opmerkingen vraagt de DEC zich af of onderzoekers niet beter met de experimenten uit bijlage 2 kunnen starten, gevolgd door een veldstudie op bedrijven met verschillende hygiënestatus. Indien u blijft bij uw voornemen de experimenten uit bijlage 1 uit te voeren zoals beschreven in bijlage 1, wat is dan de translatie van de verkregen gegevens naar de praktijk?

Wij zien zeker de meerwaarde van veldstudies bij bepaalde onderzoeksvragen. Dit is door ons daarom ook al eerder gedaan om variatie in gezondheidsstatus op bedrijven (Kampman - van de Hoek, 2015) en de relatie met o.a. eiwitvertering (zie Sakkas et al., Livestock Research rapport 'Relatie tussen bedrijfsgezondheidsstatus, technische resultaten en aminozuur stofwisseling bij vleesvarkens, 2016; bijgesloten) in kaart te brengen. Voor deze veldstudie selecteerden wij zes bedrijven met verschillende gezondheidsstatus volgens de methode zoals beschreven in het proefschrift van Kampman - van de Hoek (2015). Hoewel deze studie relevante informatie gaf over de variatie in o.a. eiwitvertering in praktijkomstandigheden, was deze variatie niet gerelateerd aan de gezondheidsstatus van het bedrijf. Daarnaast correspondeerden ook de verschillende immuun-parameters gemeten in bloedmonsters van individuele

DEC-WUR

DATUM
16 juni 2020

ONDERWERP
Advies DEC-WUR
AVD1040020209705

POSTADRES
Postbus 9101
6700 HB Wageningen

INTERNET
www.WUR.nl

CONTACTPERSOON

10.2 .e. en g

TELEFOON
10.2 .e. en g

E-MAIL
DEC@wur.nl

varkens gedurende de proefperiode, niet met de vooraf ingeschatte bedrijfsgezondheidsstatus (geschat over een periode van 1 jaar). Het vooraf inschatten van de gezondheidsstatus van een bedrijf biedt dus geen garantie op een contrast in gezondheidsstatus in de periode van meten, tussen de studie-individueen. Wij denken dat het opleggen van een experimenteel contrast in sanitaire condities daarom geschikter is om onze onderzoeksvragen te beantwoorden.

Naar aanleiding van de resultaten uit deze veldstudie zijn wij begonnen met het bestuderen van effecten van chronische, milde activering van het immuunsysteem met sanitaire condities, een variant op eerder gepubliceerd onderzoek bij INRA (zie review Pastorelli et al., 2012) en in de USA (Williams et al., 1997). De samenstelling van mest kan inderdaad variëren tussen bedrijven en over tijd, maar met de sanitaire interventie kunnen we een gecontroleerd, praktisch relevant contrast aanbrengen. Inmiddels hebben we in verschillende projecten 4 experimenten gedaan met een contrast in sanitaire condities (1 studie met vleeskuikens, Hollemans et al., unpublished en 3 studies met varkens, van der Meer et al., 2016 en 2020, en van der Peet-Schwering et al., unpublished). De resultaten uit de niet gepubliceerde studies zijn desgevraagd beschikbaar. In alle 4 de studies is het gelukt om een voldoende groot contrast te creëren met deze interventie. Daarnaast leidde het contrast tot verschillen in subklinische gezondheid en NIET tot klinische problemen. Dit maakt deze benadering interessant, vertaalbaar naar de praktijk, maar ook een goed wetenschappelijk model voor de impact van milde, chronische activering van het immuunsysteem. Uiteraard kan het voorkomen dat er ziektekiemen in de mest aanwezig zijn en we realiseren ons dat dit een risico kan zijn en monitoren de klinische gezondheid daarom goed. Daarnaast is het door deze variatie juist van belang om de studie over meerdere batches uit te voeren. Dit betekent dat we de mogelijke verschillen/variatie in de response op de sanitaire interventie kunnen bestuderen. Hiermee maken we dus binnen de studie een inschatting van de herhaalbaarheid en een inschatting van de variatie die er is. Uit de studie van van der Meer et al. (2020) blijkt bijvoorbeeld dat schijnbare fecale vertering van eiwit consistent lager was voor varkens gehouden in de lage sanitaire condities in alle batches. De groei van de varkens verschilde wel per batch, maar de verschillen tussen sanitaire condities was altijd in dezelfde richting met een lagere groei voor varkens gehouden bij de lage sanitaire condities. Verschillen in groeisnelheid waren in een range die normaal ook tussen bedrijven gezien wordt. Door het experiment over meerdere batches uit te voeren kunnen we dus een schatting maken van het effect van eiwitfermentatie op de darm bij verschillende sanitaire condities. Onze hypothese is dat eiwitfermentatie een (groter) negatief effect heeft op darmgezondheid wanneer biggen bij lage sanitaire condities gehuisvest zijn. Als dit zo blijkt te zijn, dan betekent dit voor de praktijk dat het voeren van diëten met meer laag verteerbaar eiwit erin een groter risico geeft op darmproblemen op bedrijven/afdelingen met een lagere status. Deze informatie draagt bij aan een betere afstemming tussen voeding en bedrijf. De resultaten van studies met andere modellen, zoals bijvoorbeeld met (steriele) infecties (E. Coli, Salmonella, LPS, CFA; zie o.a. proefschrift van Kampman - van de Hoek, 2015), zijn veel moeilijker te vertalen naar de praktijk, omdat deze zonder uitzondering responsen in de klinische range bestuderen (kortdurend, meestal met koortsrespons). Met het sanitaire status model verwachten wij een betere translatie naar de praktijk.

- b. De DEC wil u ook vragen naar de aard en kwaliteit van de rest- en bijproducten en de verwerkingsprocedures waaruit deze zijn voortgekomen; worden deze nader onderzocht? Gebruik van restproducten impliceert risico's met betrekking tot voedselveiligheid van zowel mens als dier.

De producten die gebruikt zullen worden zijn bijproducten die reeds op de markt zijn en voldoen aan de eisen voor voedselveiligheid. Momenteel worden veel bijproducten slechts in beperkte mate en met name aan vleesvarkens gevoerd. In de studies beschreven in appendix 2, zullen deze bijproducten in een hoger aandeel en/of aan jonge varkens gevoerd worden, en zal dieper ingegaan worden op verteringsprocessen en op de effecten op de darm.

- c. De DEC merkt op dat in de NTS de mogelijkheid tot neuscontact voor de dieren in solitaire huisvesting ontbreekt, dit is wezenlijk om te noemen, dus de DEC verzoekt u dit nog toe te voegen.

De mogelijkheid tot neuscontact is toegevoegd aan de NTS.

Datum vraag: 24-04-2020
Datum antwoord: 07-05-2020

DATUM
16 juni 2020

PAGINA
3 van 6

De DEC heeft grote twijfels bij uw besluit om toch mest van verschillende bedrijven te willen gebruiken (en dus met verschillende samenstelling) waardoor de kans bestaat dat een dergelijk onderzoek daardoor niet reproduceerbaar kan zijn.

Kunt u beter beschrijven wat de resultaten van eerdere onderzoeken waren en op grond waarvan u dan aanneemt dat het wel een gevalideerde werkwijze is?

Op de huidige beschreven wijze zou er immers ook sprake kunnen zijn van een infectieproef met het daarbij behorende ongerief? Welke ziektekiemen zouden er in de mest kunnen zitten en tot welke klinische ziekteverschijnselen kan dat dan leiden?

Het risico op infectie met het verspreiden van mest in de hokken schatten we laag in op basis van voorgaande studies. De studie van Van der Meer et al. (2016) bevatte 612 varkens, bestudeerd over het groeitraject van 20 – 110 kg lichaamsgewicht. Twee varkens zijn doodgegaan en 1 varken is met antibioticum behandeld. De studie van Van der Meer et al. (2020) werd uitgevoerd met 144 varkens in het gewichtstraject 6 - 30 kg, waarvan 1 big is doodgegaan vanwege volvulus. Verder waren er geen klinische symptomen en is er in die studie dus ook geen antibioticum toegediend. De studie van Van der Peet-Schwering et al. (2020) bevatte 408 varkens, en in de groeifase tot aan slacht zijn 11 varkens doodgegaan en 9 varkens gehuisvest in hoge sanitaire condities en 17 varkens gehuisvest in lage sanitaire condities kregen antibioticum toegediend. Deze behandelingen waren met name toegediend vanwege diarree of longproblemen. Geen van deze drie studies bleek dus achteraf een "infectieproef".

*De mest die we willen verzamelen om in de hokken te verspreiden zullen we verzamelen op bedrijven waar geen klinische problemen zijn. Om het risico op een infectie verder te minimaliseren in onze studie, zullen we de mest die we van bedrijven verzamelen, opslaan en van tevoren te screenen (met PCR) op (toxines van) pathogenen. De batches mest met een hoge aanwezigheid van een pathogeen zullen we vervolgens niet gebruiken in de gepoolde mest die we verspreiden in de hokken. De (toxines van) pathogenen waarop we screenen zijn gerelateerd aan diarree of longproblemen (*Escherichia coli* (ETEC), *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Lawsonia intracellularis*, en porcine reproductive en respiratory syndrome (PRRS) virus. Deze lijst met pathogenen hebben we opgesteld op basis van: 1. pathogenen welke we bepaald hebben in onze vorige veldstudie naar speendiarrée, 2. een enquête onder varkensdierenartsen over voorkomende pathogenen en hun klinische impact in vleesvarkens [onderdeel van het proefschrift van Esther van der Hoek – Kampman, introductie in haar PhD thesis] en 3. discussies met microbiologen en een varkensdierenarts. Met bovenstaande aanpak zal het risico op infectie en klinische problemen geminimaliseerd worden. Daarnaast zal klinische gezondheid goed gemonitord worden in de studie.*

De aanleiding voor deze studie is dat grondstoffen gebruikt in een circulaire landbouw van lagere kwaliteit zijn. Met een lage eiwitvertering van een dergelijk voer, kan dit mogelijk een negatief effect op de darm hebben, en onze hypothese is dat dit effect sterker zal zijn bij lage sanitaire condities. Dit willen we graag bestuderen om de mechanismes hierachter beter te begrijpen. We weten dat er grote verschillen zijn binnen en tussen bedrijven in bijvoorbeeld eiwitvertering en groei, terwijl hetzelfde voer gevoerd wordt en er geen klinische problemen zijn (Sakkas et al., Livestock Research rapport). Uitgangspunt voor ons is dus dat een contrast in sanitaire condities werkelijk bestaande verschillen in de praktijk nabootst zonder dat er klinische problemen zijn. Dat een contrast in sanitaire condities inderdaad verschillen in de praktijk nabootst blijkt uit de verlaging van groei en voerefficiëntie die wij zien in onze eerdere studies, en die ook gerapporteerd zijn in een review van Pastorelli et al. (2012). Deze verschillen zitten in dezelfde orde van grootte als verschillen in prestaties tussen bedrijven. Goede voeding kan nooit een oplossing zijn voor slechte huisvestingscondities, maar begrip van de mechanismes die hierachter schuil gaan is belangrijk, en aangepaste voeding helpt de impact van gegeven suboptimale condities te minimaliseren, of voorkomt erger.

*Wij denken dat het sanitaire condities model een gevalideerde werkwijze is. Uit de voorgaande studies zien we een variabele, maar aanzienlijke response van dieren op de sanitaire condities. Groei was bijvoorbeeld 6%, 10% en 22% hoger en eiwitvertering was 6, 1 en 7%-punt hoger voor varkens gehuisvest bij hoge sanitaire condities in de studie van Van der Meer et al. (2016), Van der Peet-Schwering et al. (2020; data van eerste 35 dagen) en Van der Meer et al. (2020), respectievelijk. Eén van de verschillen tussen deze studies was de mest die verspreid werd in de hokken. Zoals hierboven beschreven was het contrast in groei tussen sanitaire condities in de studie van Van der Meer et al. (2016) en Van der Peet-Schwering et al. (2020) kleiner dan het contrast in de studie van Van der Meer et al. (2020). Dit kan komen doordat in de eerste twee genoemde studies mest van slechts 1 bedrijf werd gebruikt om te verspreiden in de hokken van de varkens in de lage sanitaire condities. In de studie van Van der Meer et al. (2020) werd mest verzameld van 3 bedrijven, gepoold en verspreid in de hokken. Het creëren van een contrast met sanitaire condities is van groot belang voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen. Daarom kiezen we ervoor om mest van verschillende bedrijven te screenen, en bij afwezigheid of lage aanwezigheid van bovenstaande pathogenen, te poolen en verspreiden, om een goed contrast te krijgen (terwijl de incidentie van klinische problemen/uitval niet groter wordt, afgeleid o.b.v. de eerder genoemde studies).
De aanpassingen in het project proposal en de bijlages zijn in blauw weergegeven.*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC):
n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. N.v.t.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aangepaste aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het doel van dit project is om in varkens de effecten van een andere voersamenstelling als gevolg van kringlooplandbouw op verteringsprocessen en darmgezondheid te evalueren. Het onderzoek heeft vooral een praktische vraag: moeilijk verteerbaar eiwit worden in de dunne darm onvoldoende afgebroken en kunnen uiteindelijk in het milieu terecht komen. Daarnaast worden resten van (lokale) bijproducten of meer bewerkte bijproducten steeds vaker toegepast als onderdeel van de voeding. Deze resten hebben een hoger aandeel aan vezels of de inclusie van andere vezel-structuren en eiwit-structuren. De effecten van voer met dergelijke producten, met een hogere en andere soort vezel- en eiwit-fractie ten opzichte van gangbare voeringrediënten, op de vertering in de dunne darm zullen worden onderzocht in varkens met een verschillende hygiëne status.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en het welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan (bv. Wet Dieren en Wet Natuurbescherming).
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Directe doel : de opheldering van de rol van eiwit- en vezel fermentatie ten aanzien van darmgezondheid bij varkens.
Uiteindelijke doel : Bijdrage leveren aan de overall gezondheid en welzijn van het varken in het kader van de circulaire landbouw en de bijbehorende verandering van de ingrediënten samenstelling van varkensvoerders. Een

- efficiënt gebruik van voeder(bij)producten leidt tot een meer duurzame vleesproductie.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
De proefdieren ondervinden licht/matig ongerief; dit wordt gewaardeerd als een substantieel belang met hoge morele waarde.
De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang, het werk resulteert in publicaties, dit is van beperkte morele waarde.
Een voerfabrikant heeft mogelijk op termijn een reëel economisch belang van geringe morele waarde.
Voor de doeldieren (varkens) is er mogelijk op termijn een gezondheids-/welzijnsbelang waarvan de impact op dit moment niet goed is in te schatten.
Het gebruik van restproducten in een meer circulair gerichte industrie heeft een substantiële waarde van maatschappelijk belang.
De consument: wil graag vlees eten, beperkte morele waarde.
 6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

DATUM
16 juni 2020

PAGINA
5 van 6

Proefopzet en haalbaarheid

7. Afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IVD is de kennis en kunde voldoende gewaarborgd. Op basis van de opgegeven referenties lijkt de groep op de hoogte te zijn van soortgelijke activiteiten van andere onderzoek groepen.
8. Verteringsonderzoek en gezondheidsonderzoek in jonge biggen geeft informatie over de benutting van grondstoffen en de effecten van laagwaardig (eiwitarm/vezelrijk) voer op het dier. Het onderzoek naar de invloed van sanitaire omstandigheden zou ook in 2e instantie met een beperkt aantal voedercomponenten kunnen worden uitgevoerd. Nu streeft men ernaar om een verschil vast te stellen (door gebruik te maken van voer met hoog en laag eiwit), zouden bepaalde voederadditieven ervoor kunnen zorgen dat dit verschil meer maakt? Dit wordt eerst onder experimentele omstandigheden uitgevoerd.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: n.v.t.
10. Huisvesting wijkt volgens de onderzoekers af van de Annex III of the Directive 2010/63/EU. Dieren worden individueel gehuisvest gedurende 48 uur en op kale vloer. De huisvesting wijkt hiermee af van de eisen genoemd in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De onderzoeker heeft als argument dat de dieren anders het stro en het rubber opeet, wat een belangrijke invloed kan hebben op het onderzoek.
11. Het cumulatieve ongerief is ingeschat als mild hetgeen de Dec kan onderschrijven. De biggen krijgen geen bedding, maar wel ander spelmateriaal.
12. Naast ongerief door de solitaire huisvesting en de voor de proef noodzakelijke handelingen is er geen sprake van aantasting van integriteit.
13. Hoewel er HEP's zijn geformuleerd, zijn deze niet afhankelijk van de proef of veroorzaakt. Er zou diarree kunnen optreden (door de aanpassing van sanitaire omstandigheden) maar deze kunnen veterinaire behandeld worden en zullen geen aanleiding zijn voor een HEP. .

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Dit type onderzoek kan alleen met het doeldier worden uitgevoerd.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Het aantal dieren wordt op basis van eerder onderzoek ingeschat. Tevens wordt een poweranalyse toegepast ter bepaling van het minimaal aantal benodigde dieren.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven.

17. Duplicatie van onderzoek: aangezien hier geen sprake is van wettelijk voorgeschreven onderzoek is deze vraag in dit geval niet van toepassing.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen gebruikt worden in de proeven.
19. Een deel van de dieren worden gedood in het kader van het project volgens de methode in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. N.v.t.

NTS

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het onderzoek naar de effecten van moeilijk verteerbaar eiwit en vezelrijk voer afkomstig uit bijproducten van de kringlooplandbouw op de functie van de darm en de gezondheid van het dier het gering ongerief voor 260 varkens?
2. Het geringe nadeel voor de proefdieren weegt op tegen het belang van de overige belanghebbenden, zie ook C4 en C5.
3. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
 - Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt.
2. Onderstaande knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:

De DEC heeft uitvoerig gediscussieerd over de aanpak van de onderzoeker waarbij aan gezonde biggen mest in het verblijf wordt aangebracht afkomstig van bedrijven met verschillende hygiëne status. De IvD heeft daarover het volgende toegelicht: de IvD heeft ingestemd met het huidige voorstel (zoals beschreven in de proposal en de bijlagen) op basis van eerder behaalde resultaten. Zij is van mening dat deze aanpak interessante resultaten kan opleveren, omdat de techniek al eerder met succes is toegepast. De DEC leden hebben daar een onderling een verschillend standpunt in, hetgeen door hen vanuit verschillende expertise wordt ingebracht in de discussie. Hoewel men het doel volledig kan onderschrijven is er geen unaniem oordeel onder de DEC-leden over het gebruik van mest bij gezonde varkens om verschillende sanitaire toestanden na te bootsen. Enerzijds lijkt met deze methode de kans op herhaald, gevalideerd onderzoek klein omdat de samenstelling van mest immers steeds wisselt. Anderzijds hebben de onderzoeker al veel ervaring met deze werkwijze en zijn de resultaten bruikbaar gebleken en ondervinden de proefdieren mild ongerief. Er zal met worden verzameld van bedrijven waarvan bekend is wat er speelt en wordt geen mest gehaald bij bedrijven met een zware klinische infectie. De onderzoeker heeft echter in de tweede vragenronde de aanpak en de haalbaarheid beter onderbouwt vind het merendeel van de leden. Een van de leden vindt het geen goede proefopzet, omdat het niet gestandaardiseerd kan worden uitgevoerd.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Wageningen University & Research

10.2.e.eng

Postbus 59

6700 AW WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1040020209705

Bijlagen

3

Datum 13 juli 2020

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e.eng

Op 16 april 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs" met aanvraagnummer AVD1040020209705. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2020 tot en met 31 augustus 2025.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 25 juni 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning niet voor langer dan vijf jaar mag worden afgegeven.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Datum:

13 juli 2020

Aanvraagnummer:

AVD1040020209705

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Wageningen University & Research

Adres: Postbus 59

Postcode en plaats: 6700 AW WAGENINGEN

Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2020 tot en met 31 augustus 2025, voor het project "Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs" met aanvraagnummer AVD1040020209705, na advies van dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair docent.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 16 april 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 25 juni 2020;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 25 juni 2020;
 - c Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 25 juni 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1. Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions			
	Varkens (Sus scrofa domesticus)	160	100,0% Licht
3.4.4.2. Digestibility experiment with young pigs			
	Varkens (Sus scrofa domesticus)	100	100,0% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD1040020209705

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onvermijdelijk is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:
AVD1040020209705

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118, 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

Datum 19 april 2019

Onderwerp Verzoek Vlaanderen om deelname debat over dierproeven tbv de veehouderij

Onze referentie

Geachte commissie,

We hebben een uitnodiging gekregen van het Odisee University College in Vlaanderen om deel te nemen aan een debatnamiddag op 2 oktober in Brussel. Het onderwerp is Dierproeven tbv de Veehouderij en dit debat past in de onderzoekslijn Ethiek van het Odisee University College.

Het doel van het debat is het creëren van bewustzijn, onder meer door te toetsen hoe in Vlaanderen wordt omgegaan met het gegeven "Dierproeven ten behoeve van de veehouderij". Bestaan dergelijke dilemma's die de CCD benoemt ook in Vlaanderen? De doelgroep bestaat vooral uit de Vlaamse spelers in vergunningverlening en beleid op dierproeven: EC's, VDPC, en het Vlaamse Ministerie. Contactpersoon en organisator is **10.2.e.eng**, die vorig jaar bij de RDA met **10.2.e.eng** werkte aan de zienswijze "Dierproeven ten behoeve van de veehouderij".

De uitnodiging is specifiek gericht aan **10.2.e.eng** en **10.2.e.eng** met de vraag om een inleiding te geven over het dilemma dat de CCD als aanleiding zag voor de adviesvraag en het vervolg dat gegeven is aan het advies.

Kunt u instemmen met een bijdrage aan dit debat vanuit de CCD en zo ja, ook met de afvaardiging?

Vlaams debat "Dierproeven ten behoeve van de veehouderij" 2 oktober 2019

Doel: Bewustzijn creëren.

Doelgroep: EC's, VDPC, beleid

Over wat: Over hoe hier in Vlaanderen wordt omgegaan met het gegeven "Dierproeven ten behoeve van de veehouderij". Bestaan dergelijke dilemma's die de CCD benoemt?

We vragen reflectie in het debat op de 3 basispijlers van de redeneerlijn van de zienswijze

1. Een directe bijdrage te leveren aan het belang van de diersoort zelf. Het gaat hierbij om verbetering van gezondheid en welzijn van dieren in de veehouderij.

Dit is een visie waarbij het "nee, tenzij"-principe als uitgangspunt geldt. Indien de belangen van de doeldieren mogelijk toch geschaad worden maar er sprake is van evidente voordelen op het gebied van andere duurzaamheidsdoelen binnen de veehouderij, dient zowel de aanvrager als de CCD in een ethische afweging de belangen van de doeldieren af te wegen tegen de andere duurzaamheidsdoelen binnen de veehouderij.

2. Zoveel mogelijk bij te dragen aan een optimale balans van de doelen van duurzame veehouderij. Hierbij gaat het naast dierenwelzijn en -gezondheid onder andere om doelen op het gebied van milieu, volksgezondheid, voedselzekerheid en economie (vgl. Bos, 2010 en de omslag naar een kringlooplandbouw: LNV, 2018).

Enkel symptoombestrijding of enkel een economisch belang is onvoldoende reden voor het toelaten van een dierproef. Dergelijke doelen kunnen samen met andere doelen wel een gecombineerd argument vormen voor zo'n toelating. In het geval dat deze doelen een afweging vragen, geldt punt 1 als minimale eis met betrekking tot dierenwelzijn. Het relatieve gewicht dat aan ieder van die doelen van duurzame veehouderij toegekend wordt, is een kwestie van draagvlak en debat. Door organisatie en stimulering van een dergelijk debat met de sector en de overheid, kan de CCD meer richting geven bij het afwegen van

3. Een actieve bijdrage te leveren inzake de 3V's (vervanging, vermindering, verfijning). Door al in de agendering en opzet van het onderzoek dit aspect te betrekken is het mogelijk om innovaties te verkennen en toe te passen, en om het bewustzijn hierover bij alle betrokken partijen te vergroten.

Bijvragen in het modereren van het debat: Moet dat meegenomen worden in de kostenbatenanalyse? Hoe gaat men om met het al dan niet meenemen van duurzaamheidsprincipe in proeven met ernstig ongemak? Hoe gaat men om met ernstig ongemak, als het gaat over courante handelingen in de veehouderij (mutilaties bv.)? Laat onze gedecentraliseerd goedkeuringssysteem toe om hier op een goede heldere en efficiënte manier mee om te gaan?

Thematiseren = Het aspect van het internationaal perspectief kan in een mogelijke tweede stap beantwoord worden. We inviteren in ieder geval een heel beperkt aantal mensen van EU/EC om het debat bij te wonen. Vandaar uit kan in een tweede fase dat onderwerp in een ander debat uitgewerkt worden.

Werkwijze:

Stap 1

- A. Aanleiding in Nederland schetsen, context duiden.

- B. Vraagstelling: bestaan dezelfde dilemma's in Vlaanderen?
- C. Voorzet geven naar het vervolgverhaal: bestaan dergelijke dilemma's in ander EU-lidstaten

Stap 2

- A. Bestaan dergelijke dilemma's in andere lidstaten. Latere fase eventueel vanuit EurSafe.

Wie nodigen we uit:

1. Nederlandse kant: Om de aanleiding te kaderen: CCD (10.2 .e. en g [redacted]), RDA (10.2 .e. en g [redacted]), beleid, 10.2 .e. en g [redacted] (EZ, zit ook in alternatievenplatform van beleid DWZ)
2. Vlaamse kant: De EC's, VDPC, beleid DWZ, beleid Landbouw, BB, ... hoe uitgebreid maken we dit, veterinaire farmaceutische sector, Gaia.
3. Internationaal: afgevaardigde EU/EC: check 10.2 .e. en g [redacted] 10.2 .e. en g [redacted] (10.2 .e. en g [redacted])? Beperkt met als doel de vraag te initiëren voor EU in een volgend debat indien interesse.

Pers: In overleg met communicatiedienst, [redacted], ev. [redacted] of [redacted]? (We zien wel of ze erop afkomen ?)

Fondsen: 10.2 .e. en g [redacted] te polsen



1. Achtergrond

1.1. Dilemma

Kerntaak van de Centrale Commissie Dierproeven (CCD) is te beoordelen of projectvergunningsaanvragen voor dierproeven voldoen aan de van toepassing zijnde wet- en regelgeving. Onderdeel van deze beoordeling is het uitvoeren van een ethische toets, waarbij schade en baten worden afgewogen. Bij de ethische toets wordt afgewogen of het doel van het project en de haalbaarheid van het project het ongerief dat dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Bij deze afweging worden alle mogelijke belangen meegenomen, zoals het belang van het proefdier, het doeldier, patiënten, de wetenschap, de maatschappij, economische belangen en het milieu.

Bij de CCD zijn de afgelopen jaren meerdere onderzoeksvoorstellen ten behoeve van de (intensieve) veehouderij ingediend waarbij de Dierexperimentencommissie (DEC) en/of de CCD een dilemma constateerden. Het gaat dan specifiek om onderzoeken die gericht zijn op het ondervangen van negatieve bijeffecten van de veehouderij, maar die niet of nauwelijks bijdragen aan het wegnemen van de onderliggende oorzaken. Ook bij onderzoeken die gericht zijn op verdere optimalisatie en efficiëntieverbetering van de huidige productiesystemen voelen de CCD en DEC's zich voor een dilemma geplaatst. Dit geldt in het bijzonder voor het onderzoek waar het productievermogen van het dier zijn natuurlijke grenzen heeft bereikt of deze overschreden dreigen te worden. Beide dilemma's hangen samen met de verduurzaming van de veehouderij, waarvoor in de maatschappij in toenemende mate aandacht is.

De CCD heeft bovengenoemde dilemma's op 18 december 2015 bij de toenmalig staatssecretaris van het ministerie van Economische Zaken aanhangig gemaakt. De staatssecretaris heeft de Raad voor Dierenaangelegenheden (RDA) naar aanleiding hiervan in juni 2017 gevraagd een zienswijze op te stellen die de DEC's en de CCD helpt bij het maken van een ethische afweging bij de beoordeling van projectvergunningsaanvragen die betrekking hebben op de veehouderij.

1.2. Zienswijze RDA

Op 12 oktober 2018 heeft de RDA haar zienswijze (RDA.2018.239 zienswijze 'Dierproeven ten behoeve van de Veehouderij') gepresenteerd. In de zienswijze stelt de RDA, uitgaande van het 'Nee, tenzij'-principe, dat dierproeven gericht op de veehouderij:

1. een directe bijdrage moeten leveren aan het belang van de doeldieren zelf in de vorm van verbetering van diergezondheid en dierenwelzijn;
2. zoveel mogelijk moeten bijdragen aan een optimale balans van de doelen van duurzame veehouderij;
3. een actieve bijdrage moeten leveren aan het streven naar proefdiervrije innovaties en de 3V's (vervanging, vermindering, verfijning van dierproeven).

De CCD is van mening dat de zienswijze goede ondersteuning biedt aan de hele onderzoeksketen om dierproeven ten behoeve van de veehouderij in de toekomst beter te kunnen plaatsen in de context van de transitie naar een duurzame veehouderij, zonder dat daarvoor de verantwoordelijkheid alleen bij de onderzoeker wordt gelegd. De CCD voelt zich gesterkt door de reactie van Minister Schouten aan de Tweede Kamer d.d. 10 januari 2019. Voor de ethische afweging bij de beoordeling van aanvragen ten behoeve van de veehouderij geeft de zienswijze een heldere richting: De CCD mag in haar beoordeling meewegen of er alternatieven zijn buiten de context van het project, zoals aanpassing van de huidige veehouderijsystemen. De waarde die bij de ethische afweging toegekend mag worden aan aspecten van duurzaamheid, maar ook aan symptoombestrijding en economische baten zijn helder beschreven door de RDA. De aanbevelingen die de RDA daarbij doet voor de beoordeling van projectvergunningsaanvragen, zijn behulpzaam voor de projectbeoordeling door de CCD.

De CCD heeft de zienswijze van de RDA dan ook als basis genomen bij het opstellen van haar visie op de beoordeling van projectvergunningsaanvragen ten behoeve van de veehouderij. Dit heeft de CCD vertaald in onderstaande uitvoeringsbeleid.

Concept

2. Uitvoeringsbeleid CCD voor aanvragen ten behoeve van de veehouderij

Het uitgangspunt van de Wet op de dierproeven (Wod) is dat dieren een intrinsieke waarde hebben die moet worden gerespecteerd. Daaruit volgt het *nee, tenzij ...* beleid met betrekking tot het gebruik van proefdieren. Dit standpunt houdt in dat dierproeven niet mogen worden uitgevoerd als de doelstelling ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend (Wod artikel 10 lid 1 onder a). Daarnaast mogen dierproeven niet worden uitgevoerd als het belang van de doelstelling niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend (Wod artikel 10 lid 1 onder c). Bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen voor dierproeven, dient daarom een schade-baten analyse uitgevoerd te worden (Wod artikel 10a2 lid 2 onder d). Bij de schade-baten analyse maken de CCD en de DEC's gebruik van het 'Ethisch toetsingskader voor proefdiergebruik' (versie 14 juli 2016). In zijn algemeenheid stellen de CCD en de DEC's zichzelf de volgende vraag: rechtvaardigt het directe doel van het project, indien van toepassing aangevuld met het uiteindelijke doel, en de haalbaarheid van het project het ongerief dat dieren wordt aangedaan? Om deze vraag te kunnen beantwoorden, wordt vastgesteld wie de belanghebbenden van het project zijn en welke waarden bevorderd worden (baten) of in het geding zijn (schade). Hierbij kan gedacht worden aan het belang van het proefdier, het doeldier, patiënten, de wetenschap, de maatschappij, economische belangen en het milieu. Voor elk van de belanghebbenden wordt daarna vastgesteld welke waarden bevorderd worden (baten) of in het geding zijn (schade).

Vervolgens worden deze schade en baten gewaardeerd en tegen elkaar afgewogen. Bij de schade-baten analyse wordt niet alleen bovengenoemde weging van belangen betrokken maar ook factoren als categorieën en herkomst dieren, 3V's, ongerief, kennis en kunde van betrokkenen, haalbaarheid doelstellingen en relevante wet en regelgeving (zoals beschreven in het 'Ethisch toetsingskader voor proefdiergebruik'). Indien de schade-baten analyse negatief uitvalt, wordt geen vergunning afgegeven voor het beschreven proefdieronderzoek. Er is geen richtlijn te geven hoe de belangen en de daarmee samenhangende waarden van verschillende belanghebbenden ten opzichte van elkaar gewogen moeten worden.

Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, vindt de CCD het van belang dat de dierproeven een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren. Aan economisch belang kent de CCD om die reden een zeer beperkt belang toe. De CCD vindt het daarnaast van belang dat aanvragen niet enkel gericht zijn op symptoombestrijding, omdat deze problematiek vaak ook verminderd kan worden door aanpassing van het huidige veehouderij systeem. Symptoombestrijding op zich waardeert de CCD om die reden dan ook als een beperkt belang.

Indien aanvragen enkel een economisch belang hebben of gericht zijn op symptoombestrijding, kan de schade-baten analyse, vanwege de geringe waardering van deze belangen, negatief uitvallen. Of dit inderdaad het geval is, hangt dus samen met de mate van schade aan de proefdieren, de haalbaarheid van de doelstellingen en eventueel aanvullende baten. Indien er aanvullende baten zijn, kan de schade baten analyse door de combinatie van belangen die bevorderd worden alsnog positief uitvallen. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan:

- 1) Het leveren van een bijdrage aan proefdiervrije innovaties en/of verfijnde technieken voor huidig en/of toekomstig onderzoek.
- 2) het leveren van een bijdrage aan een duurzame veehouderij, op het gebied van bijvoorbeeld dierenwelzijn en -gezondheid, milieu, volksgezondheid, voedselzekerheid en economie.

Bovengenoemde baten waardeert de CCD als een groot belang.

3. Informatie nodig voor beoordeling projectvergunningaanvragen ten behoeve van de veehouderij

De formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning worden niet gewijzigd naar aanleiding van het nieuwe uitvoeringsbeleid van de CCD. Wel zal de toelichting op de formulieren worden aangepast om te faciliteren dat de aanvrager alle benodigde informatie over de context en belanghebbenden goed in beeld brengt. Aanpassingen in de toelichting worden hieronder in rood weergegeven (bestaande tekst is in grijs weergegeven).

Projectvoorstel: 3.1. Achtergrond

Wat is de nationale en/of internationale achtergrond, context en/of aanleiding van de onder 3.2. te beschrijven hoofddoelstelling of hoofdvraagstelling van het project? In de beschrijving dient aandacht te worden besteed aan elk van de onder 2 aangekruiste categorieën. Welke achtergrondinformatie voor de beoordeling van het project relevant is zal afhangen van de

Concept

categorie(ën) waartoe het project behoort. Ter oriëntatie worden hieronder enkele voorbeelden van onderwerpen gegeven.

In geval van (fundamenteel) wetenschappelijk en translationeel onderzoek:

- Wat is de internationale en/of nationale stand van zaken in het onderzoeksveld op dit specifieke gebied (wetenschappelijke literatuur, eigen onderzoek; refereer desgewenst naar enkele sleutelpublicaties en vat de relevante informatie uit elke referentie kort samen)?
- Welke resultaten, overwegingen, (al dan niet nieuwe) wetenschappelijke hypothesen hebben aanleiding gegeven tot dit project?
- Op welke wijze zal het project een bijdrage leveren aan de stand van zaken in het onderzoeksveld?
- betreft het een vervolg op een eerdere projectvergunning, zo ja welke?

In geval van aanvragen ten behoeve van de veehouderij:

- **Wat is het huidige beleid op het gebied van verduurzaming van de veehouderij? Bij duurzaamheid kan gedacht worden aan verbetering van dierenwelzijn en -gezondheid, milieu, volksgezondheid, voedselzekerheid en economie. Beperk u antwoord tot het veehouderijsysteem waar uw aanvraag op is gericht.**
- **Hoe verhoudt het project zich tot bovengenoemd beleid?**
- **Hoe kan de kennis opgedaan in dit project toegepast worden om het dierenwelzijn in systemen van de toekomst te verbeteren en/of het gebruik van dieren voor onderzoek te verminderen(indien van toepassing)?**

3.2 Doelstelling en haalbaarheid

3.2.1 Het directe en het uiteindelijke doel

Hier wordt gevraagd zowel het directe doel als het uiteindelijke doel van het project te beschrijven. Onder het directe doel (hoofddoelstelling) wordt hier verstaan wat specifiek met het project beoogd wordt te bereiken, bevestigen, onderzoeken, produceren, testen, verkrijgen etc. Het directe doel dient ondubbelzinnig verwoord te worden en moet in principe realistisch en haalbaar zijn binnen de looptijd van het project. Het uiteindelijke doel hoeft niet haalbaar te zijn binnen de looptijd van het project.

Het project kan bestaan uit een of meerdere onderdelen die elk hun eigen specifieke subdoel- of sub vraagstelling hebben. Deze subdoelstellingen dienen hier ook benoemd te worden. Deze vormen de onderdelen die verder beschreven worden in de 'onderzoeksstrategie' (3.4). Van alle onderdelen dient de relatie met de hoofddoelstelling duidelijk te zijn.

Indien er sprake is van secundaire doelstellingen (zoals ontwikkeling van proefdiervrije innovaties en verfijnde technieken of verduurzaming van de veehouderij) dan kunt u deze hier ook vermelden.

Projectvoorstel: 3.3 Belang

3.3.1 Wetenschappelijk en maatschappelijk belang

.....Het *maatschappelijk belang* dient ruim te worden geïnterpreteerd. Het maatschappelijk belang kan worden onderbouwd door aan te geven wat bijvoorbeeld het klinische, educatieve, of economische belang is, of het belang voor natuurbescherming en milieu.

Indien het project er naar streeft een bijdrage te leveren aan de ontwikkeling van proefdiervrije innovaties en/of verfijnde technieken, dient u hier aan te geven wat dit betekent voor toekomstig onderzoek. Voor aanvragen ten behoeve van de veehouderij dient hier aandacht te worden besteed aan de mogelijke effecten van het project op het welzijn en gezondheid van de doeldieren en de verduurzaming van de veehouderij, ook als daar geen sprake van zal zijn.

3.3.2 Belanghebbenden

Hier wordt u gevraagd aan te geven welke partijen een belang hebben bij de uitvoering van dit project en/of het behalen van de resultaten. U wordt ook gevraagd deze belangen te beschrijven. Mogelijke belanghebbenden zijn: doelgroepen, **doeldieren**, proefdieren, vergunninghouders en onderzoekers en andere voor het project relevante belangengroepen of entiteiten, zoals het milieu en de samenleving als geheel. Het is niet noodzakelijk individuele belanghebbenden te benoemen, u kunt zich beperken tot groepen belanghebbenden. Het gaat hier met name om primaire belangen. Indirecte belangen die mogelijk ooit op lange(re) termijn kunnen worden behaald, hoeven hier niet te worden benoemd.

Bijlage Beschrijving dierproeven: G Vervanging, vermindering en verfijning (huidige toelichting: vraag D)

Concept

Beargumenteer de keuze van de onder A beschreven proefopzet in het licht van de 3 V's. Dat wil zeggen, beschrijf op welke wijze methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele aanpak. Beschrijf elk van de 3V's afzonderlijk.

Vervanging:

Vermindering:

Verfijning:

Indien het project (mede) gericht is op de ontwikkeling van proefdiervrije innovaties en/of meer verfijnde technieken, en de opgedane kennis nog tijdens de looptijd van het project kan worden toegepast, geef onder vervanging of verfijning aan op welke wijze deze kennis zal worden geïmplementeerd.

4. Handreiking voor DEC's

Voor de beoordeling van een projectvergunningsaanvraag door de CCD is het advies van een dierexperimentencommissie (DEC) zwaarwegend. De DEC's maken gebruik van het door de CCD opgestelde Ethisch toetsingskader om een ethische afweging te maken en tot een advies te komen. De CCD vraagt de DEC's kennis te nemen van het nieuwe uitvoeringsbeleid van de CCD voor aanvragen ten behoeve van de veehouderij en deze op onderstaande wijze te betrekken bij de totstandkoming van haar advies.

Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, beoordeelt de CCD niet alleen of het directe en uiteindelijke doel van het project gerechtvaardigd is binnen de context van het project, maar zal de CCD ook meewegen of er, buiten de context van het project, alternatieven mogelijk zijn, zoals aanpassing van de huidige veehouderijsystemen. De CCD vraagt de DEC's om bij aanvragen ten behoeve van de veehouderij aandacht te besteden aan mogelijke alternatieven en dit bij de ethische afweging te betrekken. De CCD vindt het van belang dat in het advies van de DEC's inzichtelijk wordt gemaakt of en zo ja op welke wijze deze bredere context is gezien. Hieronder wordt aangegeven hoe de DEC's, gebruikmakend van het huidige format DEC advies, dit inzichtelijk kunnen maken.

-vraag C4: Hier beoordeelt de DEC of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Indien de DEC signaleert dat het mogelijk is om de aanvraag vanuit een andere context te beoordelen, kan de DEC hier ook aangeven of het directe doel gerechtvaardigd is binnen die andere context.

-vraag C5. Hier benoemt de DEC de belanghebbenden in het project en beschrijft zij voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden. In het ethisch toetsingskader worden een aantal mogelijke belanghebbenden genoemd en waarden die bevorderd worden of in het geding zijn waaronder doelgroepen, proefdieren en andere voor het project relevante belangengroepen of entiteiten, zoals milieu en de samenleving als geheel. De CCD vindt het van belang dat dierproeven ten behoeve van de veehouderij een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren. Om die reden vraagt de CCD de DEC om bij aanvragen ten behoeve van de veehouderij het doeldier als belanghebbende te benoemen en aan te geven welke waarden voor het doeldier bevorderd worden of in het geding zijn. Daarnaast vraagt de CCD de DEC om aan te geven of en zo ja op welke wijze en in welke mate duurzaamheid bevorderd wordt. Als belanghebbende kan hier ook de samenleving worden genoemd.

-vraag C8. Hier beoordeelt de DEC of de gekozen aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Indien de aanvrager aangeeft dat er secundaire doelen zijn als verduurzaming en de ontwikkeling van proefdiervrije en/of verfijnde technieken dan kan de DEC hier ook beoordelen of de gekozen aanpak kan leiden tot het behalen van deze secundaire doelstellingen binnen de looptijd van het project. Daarnaast kan de DEC hier aangeven of de aanvrager in de positie is om de kennis opgedaan in het project te gebruiken om het dierenwelzijn in systemen van de toekomst te verbeteren of dat hiervoor andere partijen nodig zijn.

-vragen C14, C15, C16. Hier beoordeelt de DEC of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn (C14), er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen (C15) en of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd

Concept

(C16). Indien het project (mede) gericht is op de ontwikkeling van proefdier vrije innovaties en/of meer verfijnde technieken, en de aanvrager aangeeft dat de opgedane kennis nog tijdens de looptijd van het project kan worden toegepast, vraagt de CCD de DEC dit mee te nemen bij de beantwoording van vragen C14 en C16.

-vraag D2. Hier weegt de DEC voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. De CCD vindt van belang dat de dierproeven ten behoeve van de veehouderij een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren. Enkel een economisch belang waardeert de CCD om die reden als een zeer beperkt belang en symptoombestrijding op zich waardeert de CCD om die reden als een beperkt belang. Het leveren van een bijdrage aan proefdier vrije innovaties en/of verfijnde technieken voor huidig en/of toekomstig onderzoek, en het leveren van een bijdrage aan een duurzame veehouderij, op het gebied van bijvoorbeeld dierenwelzijn en -gezondheid, milieu, volksgezondheid, voedselzekerheid en economie waardeert de CCD daarentegen als een groot belang.

De CCD geeft geen richtlijn aan de DEC's hoe de belangen en de daarmee samenhangende waarden van verschillende belanghebbenden gewaardeerd en ten opzichte van elkaar gewogen moeten worden. De DEC maakt haar eigen ethische afweging maken voor haar onafhankelijke advies. De CCD vraagt de DEC wel om aan te geven waarom zij van mening is dat bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (schade) voor de andere belanghebbende.

-vraag D3. Hier beantwoordt de DEC de centrale morele vraag gebruik makend van de onder D2 gemaakte afweging van morele waarden. Daarnaast maakt de DEC gebruik van de onder C beoordeelde moreel relevante feiten, zoals het belang van het onderzoek (C4), de haalbaarheid van de doelstellingen (C8), en de 3V's (C14, C15, C16). Zoals boven aangegeven kan de DEC bij de beoordeling van aanvragen ten behoeve van de veehouderij aangeven of (C4) het directe doel gerechtvaardigd is binnen een andere context, (C8) eventuele secundaire doelstellingen haalbaar zijn, of er andere partijen nodig zijn om de opgedane kennis in de praktijk te brengen en (C14/C16) of de opgedane kennis al gedurende de looptijd van het project zal leiden tot vervanging en/of verfijning. De CCD vraagt de DEC te onderbouwen hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel. De CCD vraagt de DEC daarnaast inzichtelijk te maken of is meegewogen of er alternatieven mogelijk zijn buiten de context van het project.

-vraag E3. Hier kan de DEC knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies benoemen. Daarbij is van belang of en zo ja op welke wijze dit in bredere context is gezien. De DEC wordt verzocht haar keuze toe te lichten.

5. Ethisch Toetsingskader

De CCD maakt bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen gebruik van het 'Ethisch toetsingskader voor proefdiergebruik' (versie 14 juli 2016). Het ethisch toetsingskader is, in lijn met het nieuwe uitvoeringsbeleid voor aanvragen ten behoeve van de veehouderij, aangepast. Aanpassingen in de toelichting worden hieronder in rood weergegeven (bestaande tekst is in grijs weergegeven).

Stap 1) Probleem definiëren

C3. Worden de 3 V's voldoende geborgd (Art. 1d, lid 1 – 3 en Art. 13 Wod)?

In de Wod is vastgesteld dat niet meer dieren gebruikt mogen worden dan nodig, maar ook niet minder dan nodig voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat. Daarnaast moeten de gebruikte methoden worden verfijnd, zodat elke vorm van pijn, lijden, angst en blijvende schade die de dieren kunnen ondervinden, wordt voorkomen of tot het minimum wordt beperkt (Art. 1d). De DEC verzekert zich ervan dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan, **en gedurende het project zal doen**, om het mogelijke ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.....

C4. Wat is het belang van het onderzoek (Art. 1c Wod) en hoe hoog schat u dat in?

.....Voor de ethische afweging is niet alleen van belang te beoordelen of de doelstelling haalbaar is, maar ook of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. **Indien het mogelijk is om de aanvraag vanuit een andere context te beoordelen, kunt u aangeven of het directe doel gerechtvaardigd is binnen die andere context.**

Concept

C6. Hoe realistisch acht u de geschetste haalbaarheid van het project?

Het EC working document 'Project Evaluation and Retrospective Assessment' stelt dat zowel de mogelijke uitkomst als de haalbaarheid van de doelstellingen van het project moet worden geanalyseerd en gewogen. Voor de ethische afweging is het van belang om te beoordelen of **alle** doelstellingen realistisch zijn verwoord en of met de voorgestelde dierexperimenten en betrokken personen die doelstellingen haalbaar zijn binnen de looptijd van het project. Het gebruik van proefdieren voor een bepaald project kan niet gerechtvaardigd worden als op voorhand helder is dat de doelstellingen niet op de beschreven wijze of met de betrokken personen behaald kunnen worden.

Stap II. Probleem analyseren

A. Inventarisatie van alle belanghebbenden in het project

Voor de ethische afweging is van belang inzicht te hebben in de belanghebbenden in het project. Mogelijke belanghebbenden zijn: doelgroepen, proefdieren, **doeldieren**, vergunninghouders en onderzoekers en andere voor het project relevante belangengroepen of entiteiten, zoals het milieu en de samenleving als geheel. Het gaat hier met name om primaire belangen. Indirecte belangen die mogelijk ooit op lange(re) termijn kunnen worden behaald dienen met terughoudendheid ingebracht te worden. Zij kunnen bij de ethische weging slechts beperkt een rechtvaardiging opleveren van het ongerief van dieren.

Tabel 1: Ethische Matrix, modificatie van Ethical Matrix, Ben Mephram. Enkele voorbeelden van kernwaarden voor de verschillende cellen zijn aangegeven.

Morele waarden	Welzijn	Autonomie	Rechtvaardigheid
Belanghebbenden			
Doelgroep(en) project	Kwaliteit, Veiligheid	Keuze vrijheid	Beschikbaarheid van bijvoorbeeld het product Proportionaliteit
Proefdieren	Gezondheid Pijn Stress	Natuurlijk gedrag	Alternatieven Proportionaliteit Intrinsieke waarde Integriteit
Vergunninghouder, Onderzoekers	Commerciële, wetenschappelijke ontwikkelingen	Vrijheid van handelen	Wetgeving (bestaande)
Doeldier	Gezondheid Pijn Stress	Natuurlijk gedrag	Alternatieven Proportionaliteit Intrinsieke waarde
Andere voor het project relevante belangengroepen of entiteiten, zoals milieu en de samenleving als geheel	Conservatie	Biodiversiteit Natuurlijkheid	Duurzaamheid Voorzorg

Stap III) Probleem wegen

B. Weging van de belangrijkste belanghebbenden en waarden die in het geding zijn of bevorderd worden en onderbouwing van deze weging

.....Van de DEC wordt verwacht dat zij voor de verschillende belanghebbenden, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar weegt. Om dit proces te vergemakkelijken kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit bijvoorbeeld verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. U wordt ook gevraagd aan te geven waarom de DEC van mening is dat bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (schade) voor de andere belanghebbende.

Er is geen richtlijn te geven hoe de belangen en de daarmee samenhangende waarden van verschillende belanghebbenden ten opzichte van elkaar gewogen moeten worden. In de huidige maatschappij wordt het echter niet meer vanzelfsprekend gevonden dat elk doel ten behoeve van de

Concept

mensen zwaarder weegt dan de belangen van het dier. Onderzoek laat namelijk zien dat mensen (70%) een sterke emotionele band met dieren hebben en dat men dierenwelzijn heel belangrijk vindt (de Cock Buning, 2012). De samenleving kent aan verschillende diersoorten echter wel een verschillende status toe. Dit blijkt bijvoorbeeld uit de Europese richtlijn waarin, door het verbinden van strengere voorwaarden aan het gebruik van non-humane primaten, honden en katten, ook een verschillende status toegedacht wordt aan verschillende soorten proefdieren (Richtlijn 2010/63/EU, Art. 31). Dit betekent dat de belangen voor verschillende diersoorten anders gewogen kunnen worden.

Voor de ethische afweging is niet alleen van belang te beoordelen of het directe doel, aangevuld met het uiteindelijke doel, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld, maar ook of de dierproef gerechtvaardigd is als van een andere context zou worden uitgegaan. Vanuit een ethische benadering zijn beide perspectieven relevant. Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, weegt de CCD mee of er alternatieven zijn buiten de context van het project, zoals aanpassing van de huidige veehouderijssystemen. Van de DEC wordt verwacht dat zij in het advies inzichtelijk maakt of is meegewogen of er alternatieven mogelijk zijn buiten de context van het project. De DEC wordt gevraagd de gemaakte keuze te onderbouwen.

Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, vindt de CCD het van belang dat de dierproeven ten behoeve van de veehouderij een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren. Enkel een economisch belang waardeert de CCD om die reden als een zeer beperkt belang. De CCD vindt het daarnaast van belang dat aanvragen niet enkel gericht zijn op symptoombestrijding. Deze problematiek kan namelijk vaak ook verminderd worden door aanpassing van het huidige veehouderij systeem. Symptoombestrijding op zich waardeert de CCD om die reden als een beperkt belang. Het leveren van een bijdrage aan 1) proefdiervrije innovaties en/of verfijnde technieken voor huidig en/of toekomstig onderzoek of 2) een duurzame veehouderij, op het gebied van bijvoorbeeld dierenwelzijn en -gezondheid, milieu, volksgezondheid, voedselzekerheid en economie waardeert de CCD daarentegen als een groot belang. Het is aan de DEC om tot een oordeel te komen wat betreft de waardering van de belangen en de daarmee samenhangende waarden en de weging van verschillende belanghebbenden.



1. Achtergrond

1.1. Dilemma

Kerntaak van de Centrale Commissie Dierproeven (CCD) is te beoordelen of projectvergunningaanvragen voor dierproeven voldoen aan de van toepassing zijnde wet- en regelgeving. Onderdeel van deze beoordeling is het uitvoeren van een ethische toets, waarbij schade en baten worden afgewogen. Bij de ethische toets wordt afgewogen of het doel van het project en de haalbaarheid van het project het ongerief dat dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Bij deze afweging worden alle mogelijke belangen meegenomen, zoals het belang van het proefdier, het doeldier, patiënten, de wetenschap, de maatschappij, economische belangen en het milieu.

Bij de CCD zijn de afgelopen jaren meerdere onderzoeksvoorstellen ten behoeve van de (intensieve) veehouderij ingediend waarbij de Dierexperimentencommissie (DEC) en/of de CCD een dilemma constateerden. Het gaat dan specifiek om onderzoeken die gericht zijn op het ondervangen van negatieve bijeffecten van de veehouderij, maar die niet of nauwelijks bijdragen aan het wegnemen van de onderliggende oorzaken. Ook bij onderzoeken die gericht zijn op verdere optimalisatie en efficiëntieverbetering van de huidige productiesystemen voelen de CCD en DEC's zich voor een dilemma geplaatst. Dit geldt in het bijzonder voor het onderzoek waar het productievermogen van het dier zijn natuurlijke grenzen heeft bereikt of deze overschreden dreigen te worden. Beide dilemma's hangen samen met de wens naar verduurzaming van de veehouderij, waarvoor in de maatschappij in toenemende mate aandacht is.

De CCD heeft bovengenoemde dilemma's op 18 december 2015 bij de toenmalig Staatssecretaris van het ministerie van Economische Zaken aanhangig gemaakt. De Staatssecretaris heeft de Raad voor Dierenaangelegenheden (RDA) naar aanleiding hiervan op 8 juni 2017 gevraagd een zienswijze op te stellen die de DEC's en de CCD helpt bij het maken van een ethische afweging bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen die betrekking hebben op de veehouderij.

1.2. Zienswijze RDA

Op 12 oktober 2018 heeft de RDA haar zienswijze (RDA.2018.239 zienswijze 'Dierproeven ten behoeve van de Veehouderij') gepresenteerd. In de zienswijze stelt de RDA, uitgaande van het 'Nee, tenzij'-principe zoals verwoord in de Wet op de Dierproeven, dat dierproeven gericht op de veehouderij:

1. een directe bijdrage moeten leveren aan het belang van de doeldieren zelf in de vorm van verbetering van diergezondheid en dierenwelzijn;
2. zoveel mogelijk moeten bijdragen aan een optimale balans van de doelen van duurzame veehouderij;
3. een actieve bijdrage moeten leveren aan het streven naar proefdiervrije innovaties en de 3V's (vervanging, vermindering, verfijning van dierproeven).

De CCD is van mening dat de zienswijze een goede ondersteuning biedt aan de gehele onderzoeksketen om dierproeven ten behoeve van de veehouderij in de toekomst beter te plaatsen in de context van de transitie naar een duurzame veehouderij. De CCD voelt zich gesterkt door de reactie van Minister Schouten aan de Tweede Kamer d.d. 10 januari 2019. De zienswijze geeft heldere handvatten voor de beoordeling van aanvragen ten behoeve van de veehouderij: De CCD kan in haar beoordeling meewegen of er alternatieven zijn buiten de context van het project, zoals aanpassing van de huidige veehouderijsystemen. Daarnaast kan de CCD in haar beoordeling meewegen hoe een aanvraag zich verhoudt tot verduurzaming van de veehouderij. Tot slot heeft de RDA helder beschreven welk belang kan worden toegekend aan aanvragen enkel gericht op symptoombestrijding of economische baten. De aanbevelingen die de RDA daarbij doet voor de beoordeling van projectvergunningaanvragen, zijn behulpzaam voor de projectbeoordeling door de CCD.

De CCD heeft de zienswijze van de RDA dan ook als basis genomen bij het opstellen van haar visie op de beoordeling van projectvergunningaanvragen ten behoeve van de veehouderij. Dit heeft de CCD vertaald in onderstaande uitvoeringsbeleid.

Concept

2. Uitvoeringsbeleid CCD voor aanvragen ten behoeve van de veehouderij

Het uitgangspunt van de Wet op de dierproeven (Wod) is dat dieren een intrinsieke waarde hebben die moet worden gerespecteerd. Daaruit volgt het *nee, tenzij ...* beleid met betrekking tot het gebruik van proefdieren. Dit standpunt houdt in dat dierproeven niet mogen worden uitgevoerd als de doelstelling ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend (Wod artikel 10 lid 1 onder a). Daarnaast mogen dierproeven niet worden uitgevoerd als het belang van de doelstelling niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend (Wod artikel 10 lid 1 onder c). Bij de beoordeling van projectvergunningsaanvragen voor dierproeven, dient daarom een schade-baten analyse uitgevoerd te worden (Wod artikel 10a2 lid 2 onder d). Bij de schade-baten analyse maken de CCD en de DEC's gebruik van het 'Ethisch toetsingskader voor proefdiergebruik' (versie 14 juli 2016). In zijn algemeenheid stellen de CCD en de DEC's zichzelf hierbij de volgende vraag: rechtvaardigt het directe doel van het project, indien van toepassing aangevuld met het uiteindelijke doel, en de haalbaarheid van het project het ongerief dat dieren wordt aangedaan? Om deze vraag te kunnen beantwoorden, wordt vastgesteld wie de belanghebbenden van het project zijn en welke waarden bevorderd worden (baten) of in het geding zijn (schade). Hierbij kan gedacht worden aan het belang van het proefdier, het doeldier, patiënten, de wetenschap, de maatschappij, economische belangen en het milieu.

Vervolgens worden deze schade en baten gewaardeerd en tegen elkaar afgewogen. Bij de schade-baten analyse wordt niet alleen bovengenoemde weging van belangen betrokken maar ook factoren als categorieën en herkomst dieren, de 3V's (vervanging, vermindering en verfijning), ongerief, kennis en kunde van betrokkenen, haalbaarheid doelstellingen en relevante wet en regelgeving (zoals beschreven in het 'Ethisch toetsingskader voor proefdiergebruik'). Indien de schade-baten analyse negatief uitvalt, wordt geen vergunning afgegeven voor het beschreven proefdieronderzoek.

Er is geen richtlijn te geven hoe de belangen en de daarmee samenhangende waarden van verschillende belanghebbenden ten opzichte van elkaar gewogen moeten worden.

Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, acht de CCD het van belang dat de dierproeven een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren of dat het project bijdraagt aan andere aspecten van verduurzaming van de veehouderij. Aan een primair economisch belang kent de CCD om die reden een beperkt belang toe. De CCD vindt het daarnaast van belang dat aanvragen niet enkel gericht zijn op symptoombestrijding, omdat deze problematiek vaak ook verminderd kan worden door aanpassing van het huidige veehouderij systeem. Symptoombestrijding op zich waardeert de CCD om die reden dan ook als een beperkt belang. De CCD vindt hierbij bovendien van belang dat het ongerief dat de dieren ondergaan beperkt wordt.

Indien aanvragen enkel een economisch belang hebben of gericht zijn op symptoombestrijding, kan de schade-baten analyse, vanwege de geringe waardering van deze belangen, negatief uitvallen. Of dit inderdaad het geval is, hangt dus samen met de mate van ongerief dat de proefdieren ondergaan, de haalbaarheid van de doelstellingen en eventueel aanvullende baten. Indien er aanvullende baten zijn, kan de schade baten analyse alsnog positief uitvallen. Bij aanvullende baten kan bijvoorbeeld gedacht worden aan:

- 1) Het leveren van een bijdrage aan proefdiervrije innovaties en/of verfijnde technieken voor huidig en/of toekomstig onderzoek.
- 2) het leveren van een bijdrage aan een duurzame veehouderij, op het gebied van bijvoorbeeld dierenwelzijn en -gezondheid, milieu, volksgezondheid, voedselzekerheid en economie.

Bovengenoemde baten waardeert de CCD als een groot belang.

Concept

3. Informatie nodig voor beoordeling projectvergunningaanvragen ten behoeve van de veehouderij

De formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning worden niet gewijzigd naar aanleiding van het nieuwe uitvoeringsbeleid van de CCD. Wel zal de toelichting op de formulieren worden aangepast om te faciliteren dat de aanvrager alle benodigde informatie over de context en belanghebbenden goed in beeld brengt. Aanpassingen in de toelichting worden hieronder in rood weergegeven (bestaande tekst is in grijs weergegeven).

Projectvoorstel: 3.1. Achtergrond

Wat is de nationale en/of internationale achtergrond, context en/of aanleiding van de onder 3.2. te beschrijven hoofddoelstelling of hoofdvraagstelling van het project? In de beschrijving dient aandacht te worden besteed aan elk van de onder 2 aangekruiste categorieën. Welke achtergrondinformatie voor de beoordeling van het project relevant is zal afhangen van de categorie(ën) waartoe het project behoort. Ter oriëntatie worden hieronder enkele voorbeelden van onderwerpen gegeven.

In geval van (fundamenteel) wetenschappelijk en translationeel onderzoek:

- Wat is de internationale en/of nationale stand van zaken in het onderzoeksveld op dit specifieke gebied (wetenschappelijke literatuur, eigen onderzoek; refereer desgewenst naar enkele sleutelpublicaties en vat de relevante informatie uit elke referentie kort samen)?
- Welke resultaten, overwegingen, (al dan niet nieuwe) wetenschappelijke hypothesen hebben aanleiding gegeven tot dit project?
- Op welke wijze zal het project een bijdrage leveren aan de stand van zaken in het onderzoeksveld?
- betreft het een vervolg op een eerdere projectvergunning, zo ja welke?

In geval van aanvragen ten behoeve van de veehouderij:

- Wat is het huidige beleid op het gebied van verduurzaming van de veehouderij? Bij duurzaamheid kan gedacht worden aan verbetering van dierenwelzijn en -gezondheid, milieu, volksgezondheid, voedselzekerheid en economie. Beperk u antwoord tot het veehouderijsysteem waar uw aanvraag op is gericht.
- Hoe verhoudt het project zich tot bovengenoemd beleid?
- Hoe kan de kennis opgedaan in dit project toegepast worden om het dierenwelzijn in veehouderijsystemen van de toekomst te verbeteren en/of het gebruik van dieren voor onderzoek te verminderen (indien van toepassing)?

3.2 Doelstelling en haalbaarheid

3.2.1 Het directe en het uiteindelijke doel

Hier wordt gevraagd zowel het directe doel als het uiteindelijke doel van het project te beschrijven. Onder het directe doel (hoofddoelstelling) wordt hier verstaan wat specifiek met het project beoogd wordt te bereiken, bevestigen, onderzoeken, produceren, testen, verkrijgen etc. Het directe doel dient ondubbelzinnig verwoord te worden en moet in principe realistisch en haalbaar zijn binnen de looptijd van het project. Het uiteindelijke doel hoeft niet haalbaar te zijn binnen de looptijd van het project.

Het project kan bestaan uit een of meerdere onderdelen die elk hun eigen specifieke subdoel- of sub-vraagstelling hebben. Deze subdoelstellingen dienen hier ook benoemd te worden. Deze vormen de onderdelen die verder beschreven worden in de 'onderzoeksstrategie' (3.4). Van alle onderdelen dient de relatie met de hoofddoelstelling duidelijk te zijn.

Indien er sprake is van secundaire doelstellingen (zoals ontwikkeling van proefdiervrije innovaties en verfijnde technieken of verduurzaming van de veehouderij) dan kunt u deze hier ook vermelden.

Projectvoorstel: 3.3 Belang

3.3.1 Wetenschappelijk en maatschappelijk belang

Het maatschappelijk belang dient ruim te worden geïnterpreteerd. Het maatschappelijk belang kan worden onderbouwd door aan te geven wat bijvoorbeeld het klinische, educatieve, of economische belang is, of het belang voor natuurbescherming en milieu.

Indien het project er naar streeft een bijdrage te leveren aan de ontwikkeling van proefdiervrije innovaties en/of verfijnde technieken, dient u hier aan te geven wat dit betekent voor toekomstig onderzoek. Voor aanvragen ten behoeve van de veehouderij dient hier aandacht te worden besteed aan de mogelijke effecten van het project op het welzijn en gezondheid van de doeldieren en de verduurzaming van de veehouderij, ook als daar geen sprake van zal zijn.

Concept

3.3.2 Belanghebbenden

Hier wordt u gevraagd aan te geven welke partijen een belang hebben bij de uitvoering van dit project en/of het behalen van de resultaten. U wordt ook gevraagd deze belangen te beschrijven. Mogelijke belanghebbenden zijn: doelgroepen, **doeldieren**, proefdieren, vergunninghouders en onderzoekers en andere voor het project relevante belangengroepen of entiteiten, zoals het milieu en de samenleving als geheel. Het is niet noodzakelijk individuele belanghebbenden te benoemen, u kunt zich beperken tot groepen belanghebbenden. Het gaat hier met name om primaire belangen. Indirecte belangen die mogelijk ooit op lange(re) termijn kunnen worden behaald, hoeven hier niet te worden benoemd.

Bijlage Beschrijving dierproeven: G Vervanging, vermindering en verfijning (huidige toelichting: vraag D)

Beargumenteer de keuze van de onder A beschreven proefopzet in het licht van de 3 V's. Dat wil zeggen, beschrijf op welke wijze methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele aanpak. Beschrijf elk van de 3V's afzonderlijk.

Vervanging:

In geval van aanvragen ten behoeve van de veehouderij dient u ook aandacht te besteden aan alternatieven buiten de context van het project, zoals aanpassing van de huidige veehouderijsystemen.

Vermindering:

Verfijning:

Indien het project (mede) gericht is op de ontwikkeling van proefdiervrije innovaties en/of meer verfijnde technieken, en de opgedane kennis nog tijdens de looptijd van het project kan worden toegepast, geef onder vervanging of verfijning aan op welke wijze deze kennis zal worden geïmplementeerd.

Concept

4. Handreiking voor DEC's

Voor de beoordeling van een projectvergunningaanvraag door de CCD is het advies van een dierexperimentencommissie (DEC) zwaarwegend. De DEC's maken gebruik van het door de CCD opgestelde Ethisch toetsingskader om een ethische afweging te maken en tot een advies te komen. De CCD vraagt de DEC's kennis te nemen van het nieuwe uitvoeringsbeleid van de CCD voor aanvragen ten behoeve van de veehouderij en deze op onderstaande wijze te betrekken bij de totstandkoming van haar advies.

Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, beoordeelt de CCD niet alleen of het directe en uiteindelijke doel van het project gerechtvaardigd is binnen de context van het project, maar zal de CCD ook meewegen of er, buiten de context van het project, alternatieven mogelijk zijn, zoals aanpassing van de huidige veehouderijssystemen. De CCD vraagt de DEC's om bij aanvragen ten behoeve van de veehouderij aandacht te besteden aan mogelijke alternatieven en dit bij de ethische afweging te betrekken. De CCD vindt het van belang dat in het advies van de DEC's inzichtelijk wordt gemaakt of en zo ja op welke wijze deze bredere context is bezien. Hieronder wordt aangegeven hoe de DEC's, gebruikmakend van het huidige format DEC advies, dit inzichtelijk kunnen maken.

-vraag C4: Hier beoordeelt de DEC of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Indien de DEC signaleert dat het mogelijk is om de aanvraag vanuit een andere context te beoordelen, kan de DEC hier ook aangeven of het directe doel gerechtvaardigd is binnen die andere context.

-vraag C5. Hier benoemt de DEC de belanghebbenden in het project en beschrijft zij voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden. In het ethisch toetsingskader worden een aantal mogelijke belanghebbenden genoemd en waarden die bevorderd worden of in het geding zijn waaronder doelgroepen, proefdieren en andere voor het project relevante belangengroepen of entiteiten, zoals milieu en de samenleving als geheel. De CCD vindt het van belang dat dierproeven ten behoeve van de veehouderij een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren. Om die reden vraagt de CCD de DEC om bij aanvragen ten behoeve van de veehouderij het doeldier als belanghebbende te benoemen en aan te geven welke waarden voor het doeldier bevorderd worden of in het geding zijn. Daarnaast vraagt de CCD de DEC om aan te geven of en zo ja op welke wijze en in welke mate duurzaamheid bevorderd wordt. Als belanghebbende kan hier ook de samenleving worden genoemd.

-vraag C8. Hier beoordeelt de DEC of de gekozen aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Indien de aanvrager aangeeft dat er secundaire doelen zijn als verduurzaming en de ontwikkeling van proefdiervrije en/of verfijnde technieken dan kan de DEC hier ook beoordelen of de gekozen aanpak kan leiden tot het behalen van deze secundaire doelstellingen binnen de looptijd van het project. Daarnaast kan de DEC hier aangeven of de aanvrager in de positie is om de kennis opgedaan in het project te gebruiken om het dierenwelzijn in systemen van de toekomst te verbeteren of dat hiervoor andere partijen nodig zijn.

-vragen C14, C15, C16. Hier beoordeelt de DEC of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn (C14), er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen (C15) en of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd (C16). Indien het project (mede) gericht is op de ontwikkeling van proefdiervrije innovaties en/of meer verfijnde technieken, en de aanvrager aangeeft dat de opgedane kennis nog tijdens de looptijd van het project kan worden toegepast, vraagt de CCD de DEC dit mee te nemen bij de beantwoording van vragen C14 en C16.

-vraag D2. Hier weegt de DEC voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. De CCD vindt van belang dat de dierproeven ten behoeve van de veehouderij een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren. Enkel symptoombestrijding of een primair economisch belang waardeert de CCD om die reden als een beperkt belang. Het leveren van een bijdrage aan proefdiervrije innovaties en/of verfijnde technieken voor huidig en/of toekomstig onderzoek, en het leveren van een bijdrage aan een duurzame veehouderij, op het gebied van bijvoorbeeld dierenwelzijn en -gezondheid, milieu, volksgezondheid, voedselzekerheid en economie waardeert de CCD daarentegen als een groot belang.

Concept

De CCD geeft geen richtlijn aan de DEC's hoe de belangen en de daarmee samenhangende waarden van verschillende belanghebbenden gewaardeerd en ten opzichte van elkaar gewogen moeten worden. De DEC maakt haar eigen ethische afweging voor haar onafhankelijke advies. De CCD vraagt de DEC wel om aan te geven waarom zij van mening is dat bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (schade) voor de andere belanghebbende.

-*vraag D3*. Hier beantwoordt de DEC de centrale morele vraag gebruik makend van de onder D2 gemaakte afweging van morele waarden. Daarnaast maakt de DEC gebruik van de onder C beoordeelde moreel relevante feiten, zoals het belang van het onderzoek (C4), de haalbaarheid van de doelstellingen (C8), en de 3V's (C14, C15, C16). Zoals boven aangegeven kan de DEC bij de beoordeling van aanvragen ten behoeve van de veehouderij aangeven of (C4) het directe doel gerechtvaardigd is binnen een andere context, (C8) eventuele secundaire doelstellingen haalbaar zijn, of er andere partijen nodig zijn om de opgedane kennis in de praktijk te brengen en (C14/C16) of de opgedane kennis al gedurende de looptijd van het project zal leiden tot vervanging en/of verfijning. De CCD vraagt de DEC te onderbouwen hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel. De CCD vraagt de DEC daarnaast inzichtelijk te maken of is meegewogen of er alternatieven mogelijk zijn buiten de context van het project.

-*vraag E3*. Hier kan de DEC knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies benoemen. Daarbij is van belang of en zo ja op welke wijze de aanvraag in bredere context is gezien. De DEC wordt verzocht haar keuze toe te lichten.

Concept

5. Ethisch Toetsingskader

De CCD maakt bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen gebruik van het 'Ethisch toetsingskader voor proefdiergebruik' (versie 14 juli 2016). Het ethisch toetsingskader wordt, in lijn met het nieuwe uitvoeringsbeleid voor aanvragen ten behoeve van de veehouderij, aangepast. Aanpassingen in de toelichting worden hieronder in rood weergegeven (bestaande tekst is in grijs weergegeven).

Stap I) Probleem definiëren

C3. Worden de 3 V's voldoende geborgd (Art. 1d, lid 1 – 3 en Art. 13 Wod)?

In de Wod is vastgesteld dat niet meer dieren gebruikt mogen worden dan nodig, maar ook niet minder dan nodig voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat. Daarnaast moeten de gebruikte methoden worden verfijnd, zodat elke vorm van pijn, lijden, angst en blijvende schade die de dieren kunnen ondervinden, wordt voorkomen of tot het minimum wordt beperkt (Art. 1d). De DEC verzekert zich ervan dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan, **en gedurende het project zal doen**, om het mogelijke ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.....

C4. Wat is het belang van het onderzoek (Art. 1c Wod) en hoe hoog schat u dat in?

.....Voor de ethische afweging is niet alleen van belang te beoordelen of de doelstelling haalbaar is, maar ook of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. **Indien het mogelijk is om de aanvraag vanuit een andere context te beoordelen, kunt u aangeven of het directe doel gerechtvaardigd is binnen die andere context.**

C6. Hoe realistisch acht u de geschatte haalbaarheid van het project?

Het EC working document 'Project Evaluation and Retrospective Assessment' stelt dat zowel de mogelijke uitkomst als de haalbaarheid van de doelstellingen van het project moet worden geanalyseerd en gewogen. Voor de ethische afweging is het van belang om te beoordelen of **alle** doelstellingen realistisch zijn verwoord en of met de voorgestelde dierexperimenten en betrokken personen die doelstellingen haalbaar zijn binnen de looptijd van het project. Het gebruik van proefdieren voor een bepaald project kan niet gerechtvaardigd worden als op voorhand helder is dat de doelstellingen niet op de beschreven wijze of met de betrokken personen behaald kunnen worden.

Stap II. Probleem analyseren

A. Inventarisatie van alle belanghebbenden in het project

Voor de ethische afweging is van belang inzicht te hebben in de belanghebbenden in het project. Mogelijke belanghebbenden zijn: doelgroepen, proefdieren, **doeldieren**, vergunninghouders en onderzoekers en andere voor het project relevante belangengroepen of entiteiten, zoals het milieu en de samenleving als geheel. Het gaat hier met name om primaire belangen. Indirecte belangen die mogelijk ooit op lange(re) termijn kunnen worden behaald dienen met terughoudendheid ingebracht te worden. Zij kunnen bij de ethische weging slechts beperkt een rechtvaardiging opleveren van het ongerief van dieren.

Tabel 1: Ethische Matrix, modificatie van Ethical Matrix, Ben Mepham. Enkele voorbeelden van kernwaarden voor de verschillende cellen zijn aangegeven.

Morele waarden	Welzijn	Autonomie	Rechtvaardigheid
Belanghebbenden			
Doelgroep(en) project	Kwaliteit, Veiligheid	Keuze vrijheid	Beschikbaarheid van bijvoorbeeld het product Proportionaliteit
Proefdieren	Gezondheid Pijn Stress	Natuurlijk gedrag	Alternatieven Proportionaliteit Intrinsieke waarde Integriteit
Vergunninghouder, Onderzoekers	Commerciële, wetenschappelijke ontwikkelingen	Vrijheid van handelen	Wetgeving (bestaande)
Doeldier	Gezondheid Pijn Stress	Natuurlijk gedrag	Alternatieven Proportionaliteit Intrinsieke waarde

Concept

Andere voor het project relevante belangengroepen of entiteiten, zoals milieu en de samenleving als geheel	Conservatie	Biodiversiteit Natuurlijkheid	Duurzaamheid Voorzorg
--	-------------	----------------------------------	--------------------------

Stap III) Probleem wegen

B. Weging van de belangrijkste belanghebbenden en waarden die in het geding zijn of bevorderd worden en onderbouwing van deze weging

.....Van de DEC wordt verwacht dat zij voor de verschillende belanghebbenden, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar weegt. Om dit proces te vergemakkelijken kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit bijvoorbeeld verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. U wordt ook gevraagd aan te geven waarom de DEC van mening is dat bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (schade) voor de andere belanghebbende.

Er is geen richtlijn te geven hoe de belangen en de daarmee samenhangende waarden van verschillende belanghebbenden ten opzichte van elkaar gewogen moeten worden. In de huidige maatschappij wordt het echter niet meer vanzelfsprekend gevonden dat elk doel ten behoeve van de mens zwaarder weegt dan de belangen van het dier. Onderzoek laat namelijk zien dat mensen (70%) een sterke emotionele band met dieren hebben en dat men dierenwelzijn heel belangrijk vindt (de Cock Buning, 2012). De samenleving kent aan verschillende diersoorten echter wel een verschillende status toe. Dit blijkt bijvoorbeeld uit de Europese richtlijn waarin door het verblijden van strengere voorwaarden aan het gebruik van non-humane primaten, honden en katten, ook een verschillende status toegedacht wordt aan verschillende soorten proefdieren (Richtlijn 2010/63/EU, Art. 31). Dit betekent dat de belangen voor verschillende diersoorten anders gewogen kunnen worden.

Voor de ethische afweging is niet alleen van belang te beoordelen of het directe doel, aangevuld met het uiteindelijke doel, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld, maar ook of de dierproef gerechtvaardigd is als van een andere context zou worden uitgegaan. Vanuit een ethische benadering zijn beide perspectieven relevant. Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, weegt de CCD mee of er alternatieven zijn buiten de context van het project, zoals aanpassing van de huidige veehouderijssystemen. Van de DEC wordt verwacht dat zij in het advies inzichtelijk maakt of is meegewogen of er alternatieven mogelijk zijn buiten de context van het project. De DEC wordt gevraagd de gemaakte keuze te onderbouwen.

Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, vindt de CCD het van belang dat de dierproeven ten behoeve van de veehouderij een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren. Enkel een economisch belang waardeert de CCD om die reden als een beperkt belang. De CCD vindt het daarnaast van belang dat aanvragen niet enkel gericht zijn op symptoombestrijding. Deze problematiek kan namelijk vaak ook verminderd worden door aanpassing van het huidige veehouderij systeem. Symptoombestrijding op zich waardeert de CCD om die reden als een beperkt belang. De CCD vindt hierbij bovendien van belang dat het ongerief dat de dieren ondergaan beperkt wordt. Het leveren van een bijdrage aan 1) proefdiervrije innovaties en/of verfijnde technieken voor huidig en/of toekomstig onderzoek of 2) een duurzame veehouderij, op het gebied van bijvoorbeeld dierenwelzijn en -gezondheid, milieu, volksgezondheid, voedselzekerheid en economie waardeert de CCD daarentegen als een groot belang. Het is aan de DEC om tot een oordeel te komen wat betreft de waardering van de belangen en de daarmee samenhangende waarden en de weging van verschillende belanghebbenden.



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene

gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Het project "kweekvlees" is erop gericht om vlees te maken uit spierstamcellen en vet stamcellen met als doel om het aantal runderen dat jaarlijks wordt geslacht voor humane voeding, drastisch te reduceren. Sinds 2011 hebben we de techniek om vlees te kweken uit deze stamcellen verbeterd en verfijnd, zodat we nu in staat zijn dit routinematig te doen. In navolging van ons zijn inmiddels wereldwijd zo'n 20 academische groepen en 35 privaat gefinancierde startup bedrijven actief in deze technologie, voor hetzij rundvlees, varkensvlees, kip of vis. Uit interactie met vele bevolkingsgroepen en media blijkt dat het idee om vlees te produceren op een manier zodat minder dieren worden geslacht, grote aantrekkingskracht heeft. Als spin-off van de Universiteit Maastricht is het bedrijf Mosa Meat, B.V. opgericht om kweekvlees op de markt te brengen. Hoewel het produceren van kweekvlees in principe een agrarisch doel is, is het product nog niet door de European Food Safety Agency (EFSA) goedgekeurd en wordt het dus door de NVWA als 'experimenteel' aangemerkt. Tot die goedkeuring is verkregen, zijn handelingen aan levende dieren die leiden tot het verkrijgen van de stamcellen nodig om te komen tot een EFSA aanvraag, aangemerkt als dierproeven. Om te komen tot een optimale productiemethode, moet de kwaliteit van de stamcellen die we uit spierbiopsieën van runderen krijgen, nog verder verbeteren [Ding, S et al. 2018, Sci Rep (8):10808]. Er zijn aanwijzingen in andere zoogdieren (muis, mens) dat leeftijd en geslacht van de donor, het aantal stamcellen per gram spierweefsel beïnvloeden. Ook kan de spiergroep waar het biopt genomen wordt bepalend zijn. Voor runderen zijn deze gegevens nog niet beschikbaar. Tenslotte zijn er in principe twee veterinaire gevalideerde manieren om spierbiopten te nemen, een naaldbiopsie of insciebiopsie. Daarbij lijkt de eerste de voorkeur te hebben vanwege de geringere belasting voor het rund, maar het moet nog worden onderzocht of een naaldbiopsie voldoende stamcellen oplevert. Dit wordt daarom in een pilotstudie eerst onderzocht. Met name de vraag op welke leeftijd van het rund het beste een biopsie kan worden genomen, vereist longitudinaal onderzoek en dus biopsieën uit dieren die in leven blijven. De belangrijkste reden om deze proef in levende dieren te doen en niet in slachtmateriaal is om een goed, wetenschappelijk onderbouwd, beeld te krijgen van de invloed van donor leeftijd op de kwantiteit en kwaliteit van de stamcellen. Het is onze ervaring met slachtmateriaal dat de leeftijdsopbouw van donoren zeer eenzijdig is. Voor koeien is de gemiddelde leeftijd meer dan 4.8 jaar en voor stieren is dat 1.6 jaar. Dat betekent dat ons inzicht in leeftijdsafhankelijkheid beperkt wordt tot runderen ouder dan 1 jaar, geen evenwichtige leeftijdsopbouw heeft en dat we ernstig gehinderd worden door de storende invloed van sekse op donorleeftijd. Als onderzoekers hebben we geen invloed op de slachtleeftijd. Wetenschappelijk is het ook overtuigender als de leeftijdsafhankelijkheid in hetzelfde individu wordt bepaald en dat heeft niet alleen met totale variabiliteit te maken maar ook met de altijd bestaande onzekerheid dat andere variabelen worden geïntroduceerd als het onderzoeksdesign niet gepaard is.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het project heeft als doel om spierweefsel te verkrijgen van koeien middels een biopsie en dat proces te optimaliseren, d.w.z. een zo groot mogelijk hoeveelheid stamcellen te krijgen. Uit het spierweefsel worden stamcellen verkregen die in staat zijn om *in vitro* grote hoeveelheden spierweefsel te produceren. Dit vereist een enorme vermenigvuldiging van stamcellen, die uiteindelijk gedifferentieerd worden naar spier of vet en deze eigenschappen bepalen de kwaliteit van de stamcellen. De kweekresultaten uit de aldus verkregen stamcellen, worden gebruikt om goedkeuring van kweekvlees door EFSA te verkrijgen.

De volgende vragen worden beantwoord:

Pilot fase:

1. Wat is de beste biopsietechniek, naaldbiopsie of insciebiopsie?

Longitudinale fase:

2. Welke leeftijd van donor dieren is het meest geschikt, cq levert de grootste opbrengst van stamcellen op, voor het nemen van biopsieën

3. Is er een sekse verschil in opbrengst van stamcellen?
4. Wat is de beste spier om de biopsieën uit te nemen, bil- of schouderspier?

We hebben al aangetoond dat we uit vers slachtmateriaal stamcellen kunnen halen die zeer effectief spier- en vetweefsel maken. De stap naar verkrijgen van hetzelfde materiaal via een biopsie is haalbaar, zoals blijkt uit voorgaand onderzoek (Bradley, R., British Veterinary Journal, 1978). Het nemen van een spierbiopsie ten behoeve van diagnostiek is ook een bestaande klinische praktijk.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Dit project is vooral van enorm maatschappelijk belang. In de wereldwijde toename in vleesbehoefte (FAO, 2006, 2011) tot aan 2050 kan niet worden voorzien door traditionele veeteelt. Bovendien draagt veeteelt 18% bij aan broeikasgas uitstoot. Er is een toenemende maatschappelijke druk om dit probleem te onderkennen en op te lossen. Kweekvlees is een van de veelbelovende oplossingen omdat het tot nu toe de enige technologie is die in staat is om vlees te maken en niet te vervangen door een plantaardig product. Het is ook evident dat het vanuit de 3V's een enorme verbetering zou zijn als we het aantal dieren in de veehouderij verminderen. De 3V-slag die gemaakt kan worden ter verfijning zoals lagere intensiteit van veehouderij is zeer groot en de vervanging van grootschalige veeteelt door cel- en weefselkweek is evident. Wetenschappelijk levert het project inzicht op in de relatie leeftijd, spiergroep en sekse van de donor met de kwaliteit en kwantiteit van spierstamcellen. Ook wordt uit deze studie duidelijk wat de meest optimale techniek is om biopsieën bij runderen te nemen voor het doel van stamcel oogst. Deze gegevens zijn beschikbaar vanuit incidentele waarnemingen in diverse species maar nooit structureel en gedegen onderzocht met wegnemen van interindividuele-, raciale- en omgevingsvariabiliteit.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Het project bestaat uit een **pilotfase** waarin gekeken wordt of een naaldbiopsie volstaat of dat er een kleine incisie moet worden gemaakt gevolgd door à vue en chirurgisch nemen van een spierbiopsie. Aan het eind van de pilot wordt bepaald welke biopsietechniek gebruikt zal worden voor de longitudinale fase. In de daaropvolgende longitudinale fase worden de experimentele vragen behandeld. Gedurende de longitudinale studie worden maximaal 6 sessies gepland met elke sessie 2 biopsieën per dier, dus 12 biopsieën per dier in totaal. De tijdstippen van de 6 sessie zijn bij geboorte en op 3-6-12-18-24 maanden leeftijd en vallen, waar mogelijk, samen in tijd met de 6-maandse bloedafnames die gedaan worden als gezondheidscheck van de kudde. De 2 biopsieën die tijdens elke sessie worden genomen, bestaan uit 1 uit de schouder en 1 uit de bil. De experimenten worden verricht op een boerderij en uitgevoerd door een bevoegd dierenarts. Deze studie biedt ons de mogelijkheid om op meerdere momenten gedurende het leven van het rund, informatie over kwantiteit en kwaliteit van hun spierstamcel populatie te krijgen.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Biopsieën worden genomen van dieren die gesedeerd en lokaal verdoofd zijn en geïmmobiliseerd worden in een behandel box. Biopsieën worden afgenomen bij geselecteerde runderen van eenzelfde ras (vleesras), beschikbaar op de boerderij. Bij elk dier worden per sessie, 2 biopsieën genomen, waarbij 0.5-1g weefsel wordt geëxtraheerd. Tijdens de pilotfase zijn dat een naald- en incisiebiopsie van dezelfde bilspier, in de longitudinale studie zijn het biopsieën uit twee verschillende spieren, een in de schouder en een in de bil. Hierna worden de biopsieën naar het lab gebracht waar de stamcellen worden geëxtraheerd, gekwantificeerd en verder gekweekt tot spier- en vetweefsel om de kwaliteit te beoordelen.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

In de pilotfase zullen eerst 8 naaldbiopsieën en incisiebiopsieën worden genomen en geanalyseerd. Hieruit wordt de meest geschikte methode geselecteerd op basis van stamcel opbrengst, die vervolgens in de longitudinale fase zal worden gebruikt. In de longitudinale fase worden de drie vraagstellingen over optimale leeftijd, geslacht en biopsieplaats verricht in één experiment. Met name het doen van twee biopsieën per sessie, een in de schouder en een in de bil, vermindert het aantal benodigde dieren in het experiment door het wegnemen van interindividuele variabiliteit (gepaarde opzet).

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Biopsieproef
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

DEC-UM Advies PV 2019-011

AVD1070020209364; Post, M.J.

Preambule

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** Kweekvlees.
3. **Titel van de NTS:** Kweekvlees.
4. **Type aanvraag:** nieuwe aanvraag projectvergunning
5. **Contactgegevens DEC:** Dierexperimentencommissie UM, contactpersoon: [REDACTED], e-mailadres: secretariaat-dec@maastrichtuniversity.nl
6. **Adviestraject (data dd-mm-jjjj):**
 - ontvangen door DEC-UM op 14-02-2020
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken op 21-02-2020
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en)
 - a. van 27-02-2020 tot 12-03-2020 (toelichtingsvragen gesteld)
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag op
 - advies aan CCD op 01-04-2020
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.
8. **Eventueel horen van aanvrager:** n.v.t.
9. **Correspondentie met de aanvrager**
 - Datum: 27-02-2020
 - Gestelde vragen: zie bijlage I
 - Datum antwoord: 12-03-2020
 - Verstrek(e) antwoord(en): zie bijlage I
 - De antwoorden hebben **wel** geleid tot aanpassing van de aanvraag
10. **Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC):** n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. **Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.** JA
2. **De aanvraag betreft** een nieuwe aanvraag.
3. **Is de DEC competent om hierover te adviseren?** JA
4. **Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies, licht toe waarom.** NEE

C. Beoordeling (inhoud)

1. **Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft** (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).

De aanvragers willen in dit project onderzoeken wat de effecten van leeftijd, sekse en type spiermateriaal zijn op de kwaliteit en kwantiteit van stamcellen verkregen uit spierbiopten. Deze stamcellen zullen vervolgens in kweek gehouden worden en vermenigvuldigd worden met als doel kweekvlees te produceren. De aanvragers zijn zeer ervaren in het maken van kweekvlees. Het ontbreken van de kennis m.b.t. de te onderzoeken parameters staat echter succesvolle opschaling en daarmee algemene toepassing van kweekvlees in de weg.

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het project lijkt de meeste kenmerken te hebben van voorbeeld 1 uit de Handreiking 'Invulling definitie project'.

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. **Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort** (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet).

Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten.

3. **Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.**

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van translationeel onderzoek, conform de door de aanvrager aangekruiste categorie. De verworven kennis kan immers direct worden ingezet om het kweekvlees productieproces te optimaliseren.

Belangen en waarden

- 4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld).**

Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzicht in de relatie tussen leeftijd, sekse en type spiermateriaal op de kwaliteit en kwantiteit van stamcellen verkregen uit spierbiopten van runderen, met als doel het optimaliseren van de biopsiemethode ten behoeve van het produceren van kweekvlees. Het uiteindelijke doel is het mogelijk te maken om de normale rundvleesconsumptie te vervangen door kweekvleesconsumptie, met een significante reductie van de rundveestapel tot gevolg. Het betreft hier een translationeel project. Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC-UM acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project.

De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag en uit informatie verstrekt door de onderzoekers na ophelderingsvragen van de DEC blijkt dat de kennis van de relatie tussen voornoemde variabelen op de opbrengst van stamcellen op dit moment te beperkt is. Deze kennis is noodzakelijk voor het verder ontwikkelen en optimaliseren van het kweekvlees productieproces. De DEC-UM is van mening dat het directe doel (het verkrijgen van inzicht in de relatie tussen leeftijd, sekse en type spiermateriaal op de kwaliteit en kwantiteit van stamcellen verkregen uit spierbiopten van runderen) ten behoeve van het optimaliseren van de biopsiemethode voor het produceren van kweekvlees gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

- 5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld).**

De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van kweekvlees als alternatief voor uit slacht verkregen rundvlees zijn de proefdieren, de onderzoekers, de industrie en de maatschappij als geheel.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn:

De dieren zullen aangetast worden in hun integriteit door de experimentele handelingen zoals: herhaalde naaldbiopsieën en/of incisie-biopsieën waarvoor dieren ook gesedeerd worden en moeten leven met de gevolgen daarvan, waaronder het ondervinden van ongerief en stress gedurende de proeven. Daarnaast worden de dieren deels beperkt in de mogelijkheden tot uitoefening van soorteigen gedrag vanwege het feit dat gebruik gemaakt wordt van dieren die al bestemd zijn voor menselijke consumptie en in een agrarische setting worden gehouden.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden:

De onderzoekers zullen kennis verkrijgen over de effecten van leeftijd, sekse en type spiermateriaal op de kwaliteit en kwantiteit van stamcellen verkregen uit spierbiopten van runderen en de beste manier om biopten te nemen bij runderen.

Waarden die voor de industrie bevorderd worden:

De industrie zal kennis over de optimalisatie van het kweekvleesproductieproces verkrijgen. Deze kennis kan mogelijk omgezet worden in patenten en octrooien die in de toekomst mogelijk tot economische en financiële valorisatie van het onderzoek kunnen leiden.

Waarden die voor de maatschappij als geheel bevorderd worden:

Kweekvleesconsumptie kan leiden tot een significante reductie van de veestapel. Dit draagt bij aan het waarborgen van de toekomstige voedselproductie. Daarnaast draagt het bij aan het terugdringen van het gebruik van grondstoffen en water, het gebruik van dieren voor consumptie en het daarmee gepaard gaande dierenleed en de reductie van de uitstoot van broeikasgassen.

- 6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.**

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn er in deze aanvraag geen aanwijzingen die aanleiding geven om effecten op het milieu te verwachten.

Proefopzet en haalbaarheid

- 7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5).**

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange betrokkenheid en internationale pioniersrol bij de ontwikkeling van kweekvlees. Dit blijkt uit de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering onder meer geïllustreerd aan de hand van publicaties in tijdschriften als: Scientific Reports, Cytotechnology, Journal of Integrative Agriculture en Annals of the New York Academy of Science.

Het blijkt ook uit de aandacht voor de drie V's en het uitgebreide voortraject waarin gebruik gemaakt is van alternatieven voor dierproeven.

- 8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).**

De DEC-UM is ervan overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten aangaande het optimaliseren van het verkrijgen van stamcellen t.b.v. kweekvleesproductie. De DEC-UM is er tevens van overtuigd dat het projectvoorstel geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak en kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

- 9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod) voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden).**

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

De proeven zullen worden uitgevoerd op een locatie buiten de instelling van de vergunninghouder, namelijk bij runderen die gehuisvest zijn in een standaard agrarische setting en bedoeld zijn voor consumptie. Naar het oordeel van de DEC-UM zijn er voldoende argumenten om dit te rechtvaardigen. Het komt het welzijn van de dieren ten goede omdat dieren in een kudde kunnen worden gehuisvest en daardoor minder worden beperkt in hun soort-specifieke gedrag. Deze situatie benadert ook beter het toekomstige scenario waarin biopten zullen worden genomen waardoor de translationele waarde van het onderzoek wordt vergroot.

- 10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.**

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager en de informatie onder punten F en G van de appendix. Hieruit blijkt dat het reguliere landbouwhuisdieren (vleesrunderen) betreft die in hun eigen omgeving blijven. De verzorging, huisvesting en voeding is professioneel georganiseerd door de veehouder en de dierenarts en staat onder controle van de NVWA en GD.

- 11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2).**

De biopsieën, volgens beide voorgestelde methoden, worden als licht ongerief ingeschat waarbij het ongerief voornamelijk veroorzaakt wordt door het hanteren en sederen van de dieren en de daardoor veroorzaakte stress. De onderzoekers schatten in dat het aantal, de herhalingen en de voorgestelde frequentie niet tot een verhoging van het cumulatief ongerief zullen leiden. De DEC-UM acht het cumulatieve ongerief als licht realistisch ingeschat.

- 12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).**

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen, namelijk het nemen van spierbiopten, waarvoor sedatie noodzakelijk is en moeten leven met de gevolgen daarvan. De dieren zullen deels beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden.

- 13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).**

Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage van minder dan 1% van de dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag. Het betreft een standaardprocedure in de reguliere landbouwpraktijk die door een gekwalificeerd dierenarts zal worden uitgevoerd waardoor vrijwel geen complicaties te verwachten zijn.

3V's

- 14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).**

De aanvragers hebben voldoende aannemelijk gemaakt in de aanvraag en in de beantwoording van de vragen van de DEC-UM, dat zij materiaal van levende dieren nodig hebben. Met name de discrepantie tussen de beschikbare leeftijden en seksen van slachtdieren voorkomt dat voldoende inzicht verkregen kan worden in de relatie tussen leeftijd en sekse en stamcelopbrengst. Daarnaast geven de onderzoekers aan dat het verkrijgen van stamcellen uit post-mortem slachtmateriaal mogelijk van invloed is op de kwaliteit en kwantiteit van de verkregen stamcellen. Om al deze redenen is het niet toereikend om voor deze proef materiaal verkregen van slachtdieren te gebruiken. De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

- 15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).**

Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat, zulks mede gebaseerd op aanwijzingen uit de beschikbare literatuur en statistische analyse middels een poweranalyse.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen, zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken. Daarnaast besteden de onderzoekers uitgebreid aandacht aan het aspect van verfijning. Zo zullen de onderzoekers een pilot-experiment uitvoeren waarin onderzocht zal worden of het mogelijk is om de biopten te nemen middels een naaldbiopsie, in plaats van een incisie biopsie uit te voeren. De eerste methode is meer verfijnd en gaat gepaard met minder ongerief. Ook zullen de onderzoekers het afnemen van de biopten zoveel mogelijk combineren met de routinematige zes maandelijke bloedafname bij de runderen. Hierdoor wordt onnodige extra stress, een belangrijke component in het ongerief voor de dieren, voorkomen.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld).

De aanvrager zal voor het beantwoorden van de hoofdvraagstellingen in het project gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, want de verschillen tussen de seksen zijn onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling.

In het pilotexperiment worden uitsluitend vrouwelijke dieren gebruikt o.b.v. de inschatting en de ervaring van de aanvrager dat meestal minder stamcellen verkregen worden uit vrouwelijke dieren. De uitkomst van de naaldbiopsie bij koeien kan daarom geëxtrapoleerd worden naar stieren.

De DEC-UM is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met beide seksen uit te voeren. Daarnaast heeft de aanvrager aannemelijk gemaakt dat het uitvoeren van de pilot met alleen vrouwelijke dieren de juiste strategie is die zal leiden tot het beste antwoord op de vraagstelling en een reductie van het aantal te gebruiken dieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

Niet van toepassing, de dieren worden niet gedood in het kader van het experiment.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Niet van toepassing.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).

Rechtvaardigt het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de relatie tussen leeftijd, sekse en type spiermateriaal op de kwaliteit en kwantiteit van stamcellen verkregen uit spierbiopten, ten behoeve van het produceren van kweekvlees, in het voorgestelde project "Kweekvlees", de schending van integriteit, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan en de stress die de dieren moeten ondergaan ten gevolge van het nemen spierbiopten?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).

- Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: licht nadeel
- Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel.
- Waarden die voor de industrie bevorderd worden: gering voordeel.
- Waarden die voor de maatschappij als geheel bevorderd worden: substantieel voordeel.

Het cumulatief ongerief dat de proefdieren zal worden aangedaan is licht ten gevolge van het herhaald nemen van spierbiopten onder sedatie. Deze afname gaat gepaard met licht ongerief, aantasting van de integriteit en stress.

Hiertegenover staan de opbrengsten voor mensen in de vorm van een reële kennistoename voor de onderzoekers, een beperkt financieel belang voor de industrie, en een substantieel belang van de maatschappij als geheel m.b.t. tot mogelijke bijdrage van kweekvlees aan de voedselvoorziening voor de menselijke soort en positieve effecten op het gebied van duurzaamheid.

Het is voorstelbaar dat de adoptie van kweekvlees ook positieve gevolgen voor het welzijn van de runderen in de veehouderij kan hebben omdat extensievere huisvestingmethodes die meer in lijn zijn met het natuurlijke gedrag van dieren tot de mogelijkheden gaan behoren. Daarnaast gaat het om een relatief klein aantal dieren, die bovendien niet apart hoeven te worden gefokt voor het experiment. Deze aspecten maken dat de ethische afweging sterker uitvalt ten gunste van een positief advies.

De DEC-UM is van mening dat de belangen van met name de onderzoekers en de samenleving in het algemeen binnen het project "kweekvlees" zwaarder wegen dan de waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot licht ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen, zoals herhaalde naaldbiopsieën en/of incisie biopsieën waarvoor dieren ook gesedeerd worden en moeten leven met de gevolgen daarvan, waaronder het ondervinden van ongerief en stress gedurende de proeven.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot het verwerven van kennis over de relatie tussen leeftijd, sekse en spiertype en de opbrengst van stamcellen na biopsie. Deze kennis zal leiden tot optimalisatie van de methodes om kweekvlees te produceren.

Dit onderzoek biedt perspectief op een meer efficiënte methode om (runder)kweekvlees te produceren waardoor de veestapel significant gereduceerd kan worden. Dit heeft positieve effecten op het welzijn van de dieren, de voedselvoorziening voor mensen en de duurzaamheid van de vleesproductie. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van reëel belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, sedatie en optimalisatie van het biopsie proces, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

- 3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld).**

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag "Rechtvaardigt het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de relatie tussen leeftijd, sekse en type spiermateriaal op de kwaliteit en kwantiteit van stamcellen verkregen uit spierbiopten, ten behoeve van het produceren van kweekvlees, in het voorgestelde project "kweekvlees", de schending van integriteit, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan en de stress die de dieren moeten ondergaan ten gevolge van het nemen spierbiopten?" bevestigend.

Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het reële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-UM is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er is een selectiemoment voorzien om dierproeven met onnodig ongerief te vermijden. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Kweekvlees" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "Kweekvlees van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld).

Het uitgebrachte DEC-UM advies is **unaniem** tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B).

Mogelijke onduidelijkheden, knelpunten of dilemma's zijn in vergadering besproken en ook met de onderzoekers gecommuniceerd (zie vragen bij onderdeel A.9 en de punten genoemd bij D. Ethische afweging). Het betrof hier met name de vraag of (delen van) het onderzoek uitgevoerd zouden kunnen worden door gebruik te maken van slachtmateriaal. In relatie met dit punt miste de DEC ook onderbouwing d.m.v. literatuur, voor een aantal van de gemaakte keuzes. Daarnaast vroeg de DEC-UM zich af of de mogelijke winst van de pilotstudie, in de vorm van een vermindering van het ongerief voor de dieren, opwoog tegen het extra gebruik van dieren.

De onderzoekers hebben een uitgebreide inhoudelijk reactie gegeven en het voorstel aangepast. Naar oordeel van de DEC zijn de gecommuniceerde punten op bevredigende wijze opgehelderd.

Bijlage I:

Vragen DEC-UM d.d. 27-02-2020 en Antwoorden VO d.d. 12-03-2020

- 1. U heeft onvoldoende onderbouwd waarom het door u gewenste materiaal verkregen moet worden uit levende dieren. De DEC-UM vraagt u om een goede onderbouwing, want op dit moment ziet zij de noodzaak voor deze dierexperimentele proef niet. Op basis van de door u verstrekte informatie denkt zij dat het mogelijk zou moeten zijn om deze dierproef geheel te vervangen door verder te werken met spiermateriaal verkregen bij de slacht. Een grotere spreiding bij experimenten op basis van slachtmateriaal is hierbij geen reden voor een proef bij levende dieren. U stelt zelf immers dat het succespercentage bij materiaal verkregen uit geslachte dieren "90%" is. Gezien de binaire uitkomstmaat (genoeg cellen of niet) is het de DEC-UM derhalve niet helder waarom materiaal afkomstig van het slachthuis per definitie niet geschikt is om (bepaalde) deelvragen te beantwoorden?**

De belangrijkste reden om deze proef in levende dieren te doen en niet in slachtmateriaal is om een goed, wetenschappelijk onderbouwd, beeld te krijgen van de invloed van donor leeftijd op de kwantiteit en kwaliteit van de stamcellen. Zoals gemeld in de aanvraag (laatste alinea van 'achtergrond'), is onze ervaring met slachtmateriaal dat de leeftijdsopbouw van donoren zeer eenzijdig is. Voor koeien is de gemiddelde leeftijd meer dan 4.8 jaar en voor stieren is dat 1.6 jaar. Dat betekent dat ons inzicht in leeftijdsafhankelijkheid beperkt wordt tot runderen ouder dan 1 jaar, geen evenwichtige leeftijdsopbouw heeft en dat we ernstig gehinderd worden door de storende invloed van sekse op donorleeftijd. Als onderzoekers hebben we geen invloed op de slachtleeftijd. Wetenschappelijk is het ook overtuigender als de leeftijdsafhankelijkheid in hetzelfde individu wordt bepaald en dat heeft niet alleen met totale variabiliteit te maken maar ook met de altijd bestaande onzekerheid dat andere variabelen worden geïntroduceerd als het onderzoeksdesign niet gepaard is.

De kwantiteit en kwaliteit van stamcellen zijn geen binaire maar continue variabelen. De binaire uitkomst geldt voor alleen voor de evaluatie van optimale biopsie-techniek. Het risico bestaat dat bij de naaldbiopsie we te weinig stamcellen overhouden om ze te selecteren (FACS) en op te kweken. Tot nu toe hadden we dat probleem niet omdat het slachtmateriaal meestal meer dan 10 gram (tegenover 0.5 gram met een naaldbiopsie) betreft en het bovendien op een andere manier (niet 'blind') verkregen wordt. "Te weinig" of "voldoende" cellen is een binaire uitkomst. Het succespercentage bij slachtmateriaal is daarom ook niet relevant voor de rechtvaardiging van dierproeven maar is alleen vermeld om aan te geven dat er redelijkerwijs aangenomen mag worden dat de proeven een resultaat opleveren.

- 2. Voor de continue productie van kweekvlees middels myosatelliet stamcellen zullen spierbiopsieën steeds weer opnieuw afgenomen moeten worden van levende dieren, wat dus ook steeds ongerief voor dieren meebrengt. De DEC-UM vraagt waarom hierop wordt ingezet in plaats van, bijvoorbeeld, geïnduceerde pluripotente stamcellen (afkomstig van runderen) die in (relatief) continue kweek gehouden kunnen worden en waar een eenmalige, minder invasieve techniek voor nodig lijkt? En, in het verlengde daarvan, of u voornemens bent om in de toekomst ook onderzoek naar de onderliggende mechanismen van de relaties tussen spier, leeftijd en sekse te doen?**

iPSCs zijn voor toepassing in voeding voorlopig geen optie vanwege de 5-voudige genetische manipulatie (GMO) die nodig is om tot die cellen te komen: de 4 Yamanaka factoren om iPSCs te krijgen en Myo-D transfectie in een later stadium om de cellen te

dwingen tot spierdifferentiatie. Zowel consumenten acceptatie als regulatoire goedkeuring van voeding worden in Europa gehinderd door GMO. Voor zover het voor de toepassing nodig is zullen we zeker onderzoek doen naar de mechanismen van de relaties tussen spier, leeftijd en sekse. Als illustratie doen we uitgebreid single cell sequencing om de mechanismen te achterhalen van stemness, verlies van stemness en vermogen om te differentiëren.

- 3. Hoewel de DEC-UM uw streven naar verfijning toejuicht, betwijfelt zij de noodzaak en de opzet van het door u voorgestelde pilot-experiment. Het gaat hierbij o.a. om de volgende punten:**
- a. Volgens de DEC-UM zou het mogelijk moeten zijn om in slachtmaterialen uit te zoeken of een naaldbiopsie volstaat, waardoor de pilot met levende dieren overbodig is.**
 - b. Het is de DEC-UM niet duidelijk waarom de bruikbaarheid van een naaldbiopsie wel in één tijdstip uitgezocht kan worden en de overige vraagstellingen (spierkeuze, leeftijd en sekse) een longitudinale aanpak vereisen.**

De biopsie procedure is wezenlijk anders dan het verkrijgen van slachtmateriaal en dat vereist een pilot-experiment in dezelfde setting als waarin de uiteindelijke biopsie wordt verricht. De biopsie is een steriele, transcutane procedure in een levend, niet verbloed, dier. In onze ervaring, zijn dit condities die vrijwel onmogelijk zijn te creëren in een slachthuis setting, waar zeer gestandaardiseerd en snel wordt gewerkt. Onmiddellijk na de stunning wordt het dier verbloed. In een rijk doorbloed weefsel als de spier wordt de biopsie beïnvloed door de aan/afwezigheid van bloed. Vervolgens wordt het dier snel ontdaan van huid wat de biopsie niet langer 'blind' maakt en bovendien technisch eenvoudiger dan wanneer deze transcutaan wordt gedaan. Als laatste zijn de procedures in een slachthuis niet steriel en is er geen tijd om het dier te scheren en de anti-septische handelingen uit te voeren.

Het uitvoeren van de biopsie op één leeftijd in de pilotstudie is een compromis dat gerechtvaardigd wordt door in hetzelfde dier steeds een naaldbiopsie en een incisie biopsie met elkaar te vergelijken zodat andere variabelen geen rol spelen. Er wordt hierbij van uit gegaan dat in de uiteindelijke procedure de techniek van de biopsie gestandaardiseerd is, en niet afhankelijk van de andere variabelen (dus niet b.v. een naald biopsie bij jonge stieren en een incisie biopsie bij oudere koeien). De invloed van spierkeuze en sekse zouden op één leeftijd gedaan kunnen worden, maar de leeftijdsafhankelijkheid uiteraard niet. Om het aantal proefdieren te beperken is ervoor gekozen om de variabelen spier en sekse te onderzoeken als onderdeel van de longitudinale proef, die primair gericht is op leeftijdsafhankelijkheid.

- 4. De DEC-UM mist een goede beschrijving van de door u gehanteerde methodologie, waardoor de volgende vragen en opmerkingen opkomen:**
- a. Wat houdt sedatie in?**
 - b. Wat is het effect van ras op uw resultaten?**
 - c. Het is onduidelijk wat de experimentele groepen zijn, waarschijnlijk betreft het twee (even grote) groepen mannelijke en vrouwelijke runderen, maar dit wordt niet duidelijk beschreven in de Appendix.**
 - d. De onderbouwing van het aantal en de keuze van de tijdstippen ontbreekt.**
 - e. Verloopt het bioteren met een 7 mm Bergströmse naald?**
 - f. Betreft het hier melkvee of vleeskoeien?**

Details in de beschrijving zijn op advies van de IvD geschrapt. Het is aan te bevelen

dat onderzoekers hier eenduidig in worden geadviseerd. De details zijn weer opgenomen in de nieuwe versie van de bijlage onder 'Pijn en Pijnbestrijding' en 'Overige aantasting van het welzijn en maatregelen'.

Ad b: Ras is geen variabele in dit onderzoek. In een eerder onderzoek in samenwerking met een andere Universiteit hebben we slachtmateriaal van drie rassen met zeer uiteenlopende snelheid van spier/vlees toename onderzocht en geen verschillen gevonden in kwantiteit en kwaliteit van verkregen stamcellen (publicatie in voorbereiding).

Ad c.

- 5. De DEC-UM mist de onderbouwing van de inschatting van het ongerief. Blijkbaar worden beide biopsie-methodes als licht ongerief gekarakteriseerd. Dit is relevant, omdat er extra dieren aangevraagd worden om tot een verfijning te komen die op de schaal, zoals deze gehanteerd wordt door de CCD, geen effect heeft op de totale ongeriefscore. Het is hierom lastig te beoordelen of het een verfijning betreft die het gebruiken van meer dieren rechtvaardigt. Ook zou de DEC-UM graag uw visie op de relatie tussen het ongerief en de leeftijd van de dieren willen vernemen m.n. gaat biopsie gepaard met meer ongerief bij jongere dieren?**

Het aantal benodigde dieren is, zoals gemeld in de bijlage, gebaseerd op een poweranalyse en is niet gerelateerd aan de ongeriefscore. De keuze voor een naaldbiopsie of een incisie biopsie is relevant maar beiden vallen inderdaad binnen de categorie licht ongerief (volgens de geconsulteerde dierenarts). De geringere invasiviteit en de kleinere resulterende wond van de naaldbiopsie ten opzichte van de incisie biopsie, zal leiden tot een lager risico op infectie en gestoorde wondgenezing. Daarom is het maken van de keuze toch belangrijk.

Voor zover wij kunnen nagaan, zijn er geen gegevens beschikbaar over de leeftijdsafhankelijkheid van het ongerief na een biopsie. Chirurgische ervaring leert dat elke wond in een klein dier relatief groot is. Daar staat tegenover dat wonden in jonge dieren sneller en beter genezen dan in oudere dieren. Diagnostische spierbiopsieën worden meestal gedaan in zeer jonge dieren (Bradley, R., 1978. British Veterinary Journal 134(5): 434-444).

- 6. De DEC-UM vraagt waarom er (toch) wordt verwacht dat er een humaan eindpunt kan optreden? Dat is niet in lijn met de beschrijvingen (waarvan het meest duidelijk in de NTS gegeven). In het verlengde daarvan vraagt de DEC-UM zich af wat er bedoeld wordt met "uit het experiment halen"? Gaat dit gepaard met een euthanasie of wordt het dier dan behandeld? Tevens vraagt de DEC-UM of de biopsie dan ook verder niet meer wordt meegenomen in de analyse?**

We zijn ervan uitgegaan dat het beschrijven van humane eindpunten een verplichting is, hoe klein de kans ook is dat we daarmee te maken krijgen. In een grote humane studie naar de effectiviteit en veiligheid van naaldbiopsieën (13.500 biopsieën), was de complicatie frequentie 0.15% en de complicaties werden omschreven als 'minor' (Tarnopolsky, M. A., et al., 2011. Muscle & Nerve 43(5): 716-725).

"Uit het experiment nemen" wil in dit geval zeggen dat we verder afzien van biopsieën in dat dier en dat het dier zondig wordt behandeld op geleide van het oordeel van de dierenarts. Als dit dier deel uitmaakt van de longitudinale studie, wordt het sample niet meer meegenomen voor analyse. Voor het pilot deel van de studie zijn de biopsieën toch al genomen en zal afhankelijk van de kwaliteit van de biopsie worden besloten of het meegenomen kan worden in de analyse.

7. De DEC-UM vraagt of uit de verkregen stamcellen zowel spier- alsook vetcellen worden gekweekt? Of moet de aangevraagde proef op een later moment nog eens voor vetweefsel herhaald worden?

De verkregen stamcellen vallen bestaan uit twee populaties. Een ervan is geschikt om spierweefsel te maken en de andere om vetweefsel te maken. De proef hoeft dus niet te worden herhaald.

8. U claimt dat rundvlees het meest milieubelastend en meest grondstoffenintensief is en dat u daarom focust op vervanging daarvan. Vlees afkomstig van melkvee (stiertjes, afgevoerde melkkoeien) scoort echter hoger op de 'dierlijk eiwit output / human-edible eiwit input' dan zowel varkensvlees als pluimveevlees (bv. Wilkingson and Lee 2017). Consumptie van human-edible eiwit direct door mensen heeft natuurlijk een lagere milieubelasting dan via een tussenstap middels vervoederen aan dieren. Op basis hiervan vraagt de DEC-UM of netto dan nog steeds de claim volgehouden kan worden dat rundvlees het meest milieubelastend en meest grondstoffenintensief is?

We baseren onze evaluatie op consensus rapporten van de FAO in 2006 en 2011, waarbij een groep deskundige, onafhankelijke, wetenschappers gekeken heeft naar de milieubelasting en grondstoffen verbruik in de veeteelt. (FAO (2006). "Livestock's long shadow -environmental issues and options." [FAO publications](#). FAO (2011). "World Livestock 2011. Livestock in food security." [FAO publications](#)). Die rapporten gaan uit van vleesrunderen die in het grootste deel van de wereld (Nederland is een van de uitzonderingen) gebruikt worden voor vleesproductie en niet van een combinatie van melk- en vleesproductie. Naast de te verwachten voordelen voor het milieu en grondstoffen verbruik, biedt kweekvlees ook voordelen op het gebied van antibiotica gebruik en dierenwelzijn. Dit geldt in gelijke mate voor alle species en dus ook voor runderen. Zoals vermeld in uw aanhef al met al een "dienstbaar doel".



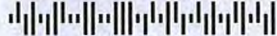
> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Maastricht

10.2.e. en g

Postbus 616 6

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1070020209364

Bijlagen

1

Datum 24 april 2020

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e. en g

Op 13 februari 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Kweekvlees" met aanvraagnummer AVD1070020209364. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 27 april 2020 tot en met 1 april 2023.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC-UM (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 1 april 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Datum:
24 april 2020
Aanvraagnummer:
AVD1070020209364

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Maastricht

Adres: Postbus 616

Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT

Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 27 april 2020 tot en met 1 april 2023, voor het project "Kweekvlees" met aanvraagnummer AVD1070020209364, na advies van dierexperimentencommissie DEC-UM.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is hoogleraar Fysiologie/CSO Mosa Meat B.V..

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 13 februari 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 1 april 2020;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Biopsie proef, zoals ontvangen op 1 april 2020;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 1 april 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 1 april 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Biopsie proef			
	Runderen (Bos taurus)	20	100,0% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IVD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD1070020209364

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:

AVD1070020209364

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Locatie

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

Form

Project proposal• This form should be used to write the project proposal of animal procedures.

- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10300202114613
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
- 1.3 Provide the title of the project. De rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic Research
- Translational or applied research
- Regulatory use of routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Proteïnurie is de aanwezigheid van een te grote hoeveelheid eiwit in de urine. Proteïnurie is één van de eerste kenmerken van nierschade en daarnaast ook een onafhankelijke risicofactor voor progressie naar nierfalen (1). Er zijn meerdere oorzaken voor het ontstaan van proteïnurie waaronder een veel voorkomende nierfilterontsteking is. Bij het ontstaan van nierfilterontsteking wordt er schade aangebracht aan het nierfilter, welke bestaat uit glomerulaire endotheelcellen met een dikke suikerlaag (glycocalyx), de glomerulaire basaalmembraan (GBM) en podocyten. Alle lagen van dit nierfilter dienen intact te zijn voor een normale filterfunctie.

Heparan sulfaat (HS) is een negatief geladen polysaccharide dat aanwezig is in alle lagen van het nierfilter. Door zijn negatieve lading speelt HS een belangrijke rol in de ladingsafhankelijke permeabiliteit van het nierfilter. Dit is ook terug te zien in verschillende patiënten en diermodellen waarin de expressie van HS in het nierfilter sterk is verminderd in geval van proteïnurie (2). De afname van HS-expressie en de daaraan gecorreleerde proteïnurie is geassocieerd met een verhoogde expressie van heparanase 1 (HPSE1), een enzym dat verantwoordelijk is voor afbraak van HS (3-5). In de afgelopen jaren hebben wij aangetoond dat HPSE1 essentieel is voor het ontstaan van proteïnurie en uiteindelijk nierschade in diermodellen voor nierfilterontsteking (6, 7). Ondanks dat het een geaccepteerd feit is dat glomerulair HPSE1 een belangrijke rol speelt in het ontstaan van proteïnurie, bestaat er nog veel onduidelijkheid over de exacte bron van glomerulair HPSE1. Naast glomerulaire cellen zoals glomerulaire endotheelcellen en podocyten kunnen ook immuuncellen, ondermeer macrofagen en neutrofielen, HPSE1 produceren en activeren. Verder is aangetoond dat depletie van macrofagen en neutrofielen een verlaagd risico geeft op proteïnurie en nierschade in modellen voor glomerulaire ziekten (8, 9). In recente studies is "sensitisatie" van macrofagen door HPSE1 aangetoond (10, 11). Sensitisatie houdt in dat immuuncellen, maar wellicht ook niercellen, sterker op een ontstekingsprikkel reageren in aanwezigheid van HPSE1 dan in afwezigheid van HPSE1. Het is aannemelijk dat sensitisatie de mate van proteïnurie en nierfilterontsteking versterkt. Er wordt gedacht dat de receptoren TLR2 en TLR4 een rol spelen in deze HPSE1 gemedieerde sensitisatie, omdat TLR2 en TLR4 heparansulfaat-fragmenten kunnen binden (12, 13).

HPSE1 wordt geproduceerd in een inactieve vorm (pro-HPSE1) waarvan bekend is dat het signalerende activiteiten heeft. Echter, verwacht wordt dat niet pro-HPSE1 maar het enzymatisch actieve HPSE1, welke geactiveerd wordt door cathepsin L (CTSL), van belang is in HPSE1 gemedieerde sensitisatie. Indirect is CTSL daardoor ook betrokken bij HPSE1 gemedieerde sensitisatie, en wellicht draagt CTSL daardoor bij aan de mate van proteïnurie en nierfilterontsteking (14).

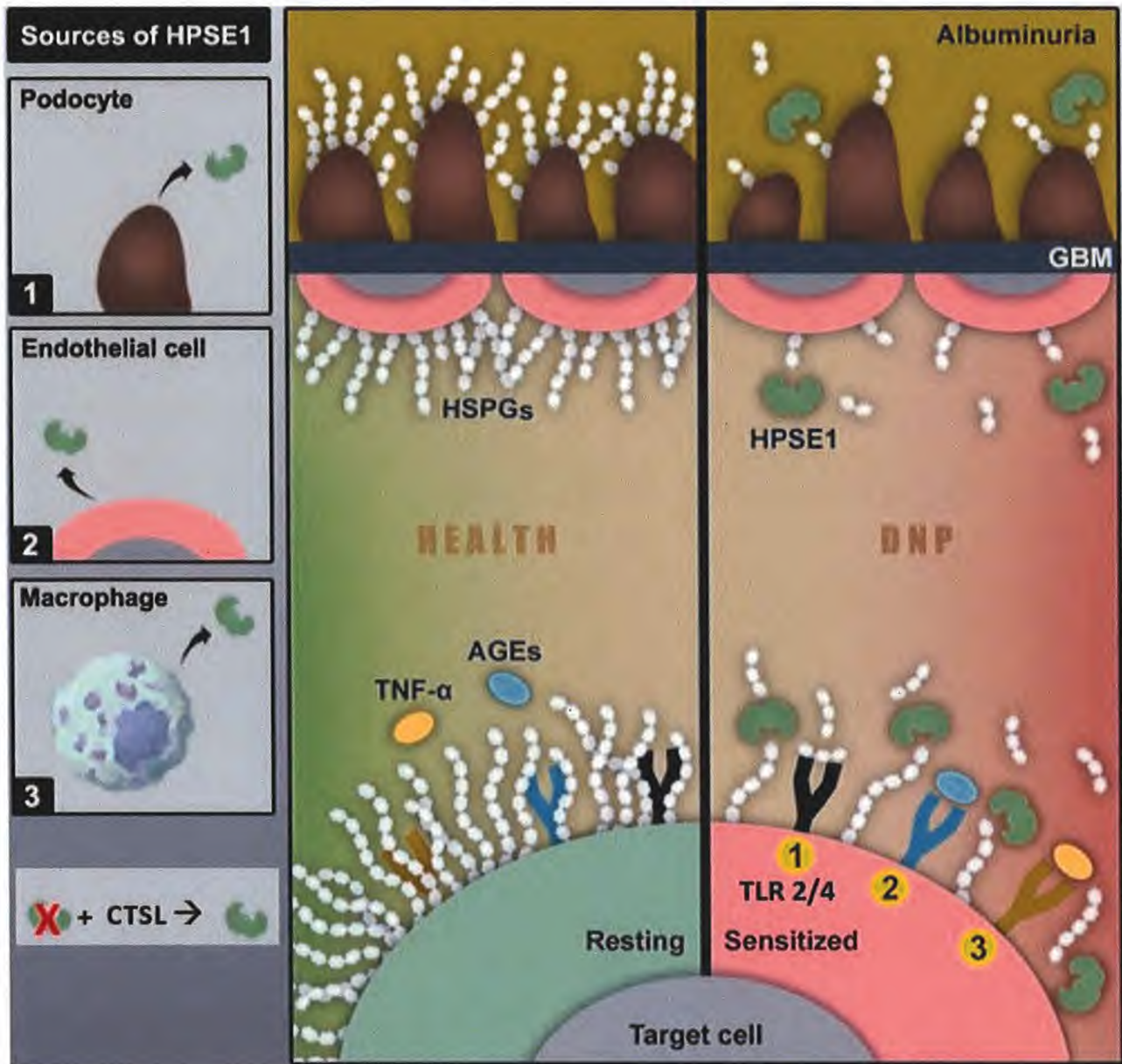
Momenteel zijn de therapeutische mogelijkheden voor de behandeling van proteïnurie beperkt en onvoldoende effectief. Het is dan ook uitermate belangrijk om nieuwe therapieën te ontwikkelen voor de behandeling van proteïnurie. Aangezien HPSE1 een prominente rol speelt in het ontstaan van proteïnurie, is het een uitgelezen therapeutisch target om proteïnurie en nierschade te verminderen en/of voorkomen. Het is echter nog niet duidelijk op welke cellen (glomerulaire cellen of immuuncellen) een HPSE1 gerichte therapie het best zou kunnen worden gericht. Kennis over de mate waarin verschillende cellen (glomerulaire cellen versus immuuncellen) een rol spelen in productie/activatie van HPSE1 in de glomerulus zal bijdragen aan het ontwikkelen van meer gerichte cel-specifieke therapieën waarin HPSE1 wordt geremd.

Naast cel-specifieke therapieën is het van belang om HPSE1 remmers te testen die systemisch kunnen worden toegepast. Momenteel zijn er enkele HPSE1 remmers in ontwikkeling die gebaseerd zijn op heparine. Echter, medicijnen gebaseerd op heparine hebben ongunstige bijwerkingen en kunnen zelf ook het immuunsysteem activeren en daardoor bijdragen aan het ontstaan van nierschade, waardoor het effect van op heparine gebaseerde HPSE1 remmers beperkt is. Een mogelijke fysiologisch relevante kandidaat voor HPSE1 remming is heparanase 2 (HPSE2), een structurele, maar inactieve, homoloog van HPSE1. Aangezien HPSE2 lichaamseigen is, zal deze, in tegenstelling tot op heparine gebaseerde HPSE1 remmers, niet leiden tot activatie van het

immuunsysteem. Zeer recent zijn HPSE2-deficiënte muizen ontwikkeld. Het feit dat deze HPSE2-deficiënte muizen proteïnurie ontwikkelen en sterven binnen één maand na geboorte suggereert dat aanwezigheid van HPSE2 in de nier erg belangrijk is om de ontwikkeling van proteïnurie en nierschade te voorkomen (15). In ons eigen vooronderzoek hebben wij laten zien dat zowel intact eiwit als peptides van HPSE2 een volledige bescherming geven op het gebied van nierschade in het LPS muis model (manuscript in voorbereiding) en dit beschermend effect van HPSE1 werd recent bevestigd door een andere groep (16). Daarnaast is de toepassing van glycosaminoglycaan (GAG) materiaal een veelbelovende op HPSE1 gerichte therapie voor nierfilterontsteking. Wij hebben *in vitro* al laten zien dat GAGs HPSE1 kunnen remmen, wat een mogelijke indicatie is voor toepassing van GAGs in bescherming van schade aan glomerulaire cellen. Het nut van GAGs werd bevestigd in een voorgaand muisonderzoek van onze afdeling waarin GAG-fragmenten tegelijk werden geïnjecteerd met anti-GBM konijn IgG waarna de muizen minder ziekte symptomen en inflammatie ontwikkelden (manuscript in voorbereiding). Aangezien ons recent *in vitro* onderzoek heeft aangetoond dat er grote verschillen zijn in de effectiviteit van HPSE1 remming tussen verschillende GAG-fracties, is het nu van belang om de systemische toediening van de meest potente GAG fracties te testen in bescherming tegen nierfilterontsteking in muizen.

Samenvattend, in dit onderzoek willen we eerst onderzoeken welke relatieve bijdragen glomerulaire cellen en immuuncellen hebben in de ontwikkeling van nierfilterontsteking door productie en activatie van HPSE1 in het nierfilter. Verder zal het onderliggende mechanisme nader worden onderzocht. Tot slot, willen we deze informatie gebruiken om het effect te bestuderen van gerichte HPSE1 remming in zowel glomerulaire cellen als immuuncellen, en dit vergelijken met het effect van systemische HPSE1 inhiberende behandeling.

Het induceren van nierfilterontsteking kan op verschillende manieren. Aangezien nierfilterontsteking bij mensen gekarakteriseerd wordt door de influx van immuun cellen, proteïnurie en verslechterde nierfunctie zijn dit belangrijke symptomen die aanwezig moeten zijn in het ziektemodel. In dit onderzoek willen we daarom gebruik maken van het sublethale LPS- geïnduceerde model en het anti-GBM-model. Zowel het anti-GBM als het sublethale LPS geïnduceerde nierfilterontstekingmodel zijn in de literatuur geaccepteerde modellen voor het induceren van nierfilterontsteking. Beide modellen gaan gepaard met de belangrijkste karakteristieke van nierfilterontsteking in de humane situatie: 1. influx van immuuncellen (welke gemeten zullen worden door IF kleuringen en/of ELISA) 2. Proteïnurie (welke gemeten zal worden door het bepalen van de albumine en creatinine waardes in de urine van de muizen) en 3. verslechterde nierfunctie die gemeten zal worden door creatinine te meten in het bloed. Deze twee modellen zijn verder geschikt omdat ze eerder succesvol door ons gebruikt zijn in volledige HPSE1 knock-out muizen en daardoor betrouwbare ziektemodellen zijn waarbij we precies weten waar we op moeten letten en wat we kunnen verwachten (6).



Figuur 1: Grafische samenvatting van de moleculaire mechanismen die onderzocht zullen worden. Verschillende type cellen (podocyten, endotheel cellen en macrofagen) kunnen een bron of target zijn voor HPSE1. In dit figuur is de target cel een endotheelcel, echter zouden dit ook podocyten of imuuncellen kunnen zijn aangezien er verwacht wordt dat er een samenwerking is tussen deze verschillende celtypes. In de gezonde toestand zijn de cellen bedekt met heparan sulfaat (afgebeeld als witte suiker ketens (HSPGs)). Deze heparan sulfaten worden afgebroken door HPSE1 na activatie door CTSL. Wanneer de heparan sulfaatketens zijn weggehaald van het celoppervlak kunnen de cellen worden gesensitiseerd door verschillende mechanisme: 1. Het binden van heparan sulfaat fragmenten aan TLR2/4 (aangetoond bij **receptor 1**); 2. Cytokines of andere activators zoals TNF α (cytokine) en AGEs (advanced glycosylation endproducts) die normaal aan HS binden en maar vrijkomen door HS afbraak door hPSE1, waardoor zij gemakkelijker aan hun receptoren (**receptor 2 en 3**) kunnen binden en de cellen gesensitiseerd worden door HPSE1; 3. Doordat de receptoren (**receptor 1,2 en 3 (maar ook vele andere)**) makkelijker bereikbaar zijn voor hun liganden, wanneer heparansulfaten zijn afgebroken door HPSE1.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

Het **hoofddoel** van dit onderzoek is inzicht krijgen in de rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde sensitisatie van nier- en immuuncellen in diermodellen voor nierfilterontsteking. Daarnaast zal de verkregen informatie gebruikt worden voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor mogelijke remming van HPSE1 om proteïnurie en nierschade te verminderen en/of te voorkomen.

Doelstelling **dealexperiment A**: De bijdrage vaststellen van glomerulaire cellen versus immuuncellen in HPSE1 gerelateerde nierfilterontsteking en de rol van endogeen HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie. Dit zal worden onderzocht door middel van respectievelijk, muismodellen waarin of wel de glomerulaire cellen of wel de immuuncellen HPSE1 deficiënt zijn als in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van HPSE1 deficiënte muizen.

Doelstelling **dealexperiment B**: De rol bestuderen van CTSL leidend tot enzymatisch actief HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van CTSL deficiënte muizen.

Doelstelling **dealexperiment C**: De rol bestuderen van TLR2/4 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie in nierfilterontsteking zowel in muismodellen waarin of wel de glomerulaire cellen of wel de immuuncellen TLR2/4 deficiënt zijn, en in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van TLR2/4 deficiënte muizen.

Doelstelling **dealexperiment D**: Het effect onderzoeken van HPSE1 remming door verschillende systemische behandelingen, en cel-specifieke behandelingen van glomerulaire- en immuuncellen, met HPSE1 remmers in muismodellen voor nierfilterontsteking.

Dit project zal zowel fundamentele als translationele kennis opleveren die kunnen bijdragen aan toekomstige ontwikkeling van een meer gerichte therapie voor nierfilterontsteking middels HPSE1 remming. Binnen de projectduur is deze doelstelling realistisch en haalbaar vanwege de uitgebreide expertise binnen de projectgroep. Recent zijn de beoogde muismodellen gebruikt in de onderzoeksgroep voor gerelateerde projecten. Daarnaast worden de experimenten uitgevoerd in het Centraal Dieren Laboratorium (CDL), waar alleen ervaren, bevoegd en gecertificeerd personeel betrokken is bij de uitvoering van de betreffende handelingen. De gekozen proefopstelling is zodoende uitvoerbaar binnen de voorgenomen kaders.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Momenteel leidt ongeveer 10% van de mensen wereldwijd (6,7% in Nederland) aan chronische nierziekten, waaronder nierfilterontsteking, welke kunnen leiden tot eindstadium nierfalen. Patiënten met nierfalen zijn momenteel volledig afhankelijk van niervervangende therapie, zoals dialyse en indien mogelijk niertransplantatie. De incidentie en prevalentie van chronische nierziekten is in de afgelopen jaren toegenomen en het is daardoor niet onwaarschijnlijk dat deze stijgende trend zal doorzetten. Dit zal enorme maatschappelijke consequenties hebben, ondermeer omdat de zorg voor deze patiëntencategorie zeer duur is. Het is daarom uitermate belangrijk om methoden te vinden die nierziekten kunnen voorkomen, dan wel de progressie naar eindstadium nierfalen kunnen uitstellen of voorkomen.

Proteïnurie is één van de eerste kenmerken van nierschade en tevens een onafhankelijke risicofactor voor de progressie naar nierfalen. De therapeutische mogelijkheden voor de behandeling van proteïnurie zijn momenteel beperkt en onvoldoende effectief. Het is daarom van cruciaal belang dat er nieuwe therapeutische strategieën worden ontwikkeld voor de behandeling van proteïnurie. Om therapieën zo effectief mogelijk te maken is het belangrijk om een goed beeld te hebben van wat precies een rol speelt in de ontwikkeling van proteïnurie en welke celtypes hierbij betrokken zijn. Het wetenschappelijk belang van dit project is inzicht krijgen in de rol van glomerulaire cellen versus

immuuncellen in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en de daaruit voortvloeiende ontwikkeling van proteïnurie en nierschade. Daarnaast zal meer inzicht worden verkregen over het effect van HPSE1 remming zowel systemisch als cel-specifiek in glomerulaire cellen en immuuncellen. De uitkomst van dit project kan bijdragen aan de ontwikkeling van een effectieve therapie voor de behandeling van proteïnurie en daarmee nierfalen voorkomen.

3.4 Research Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

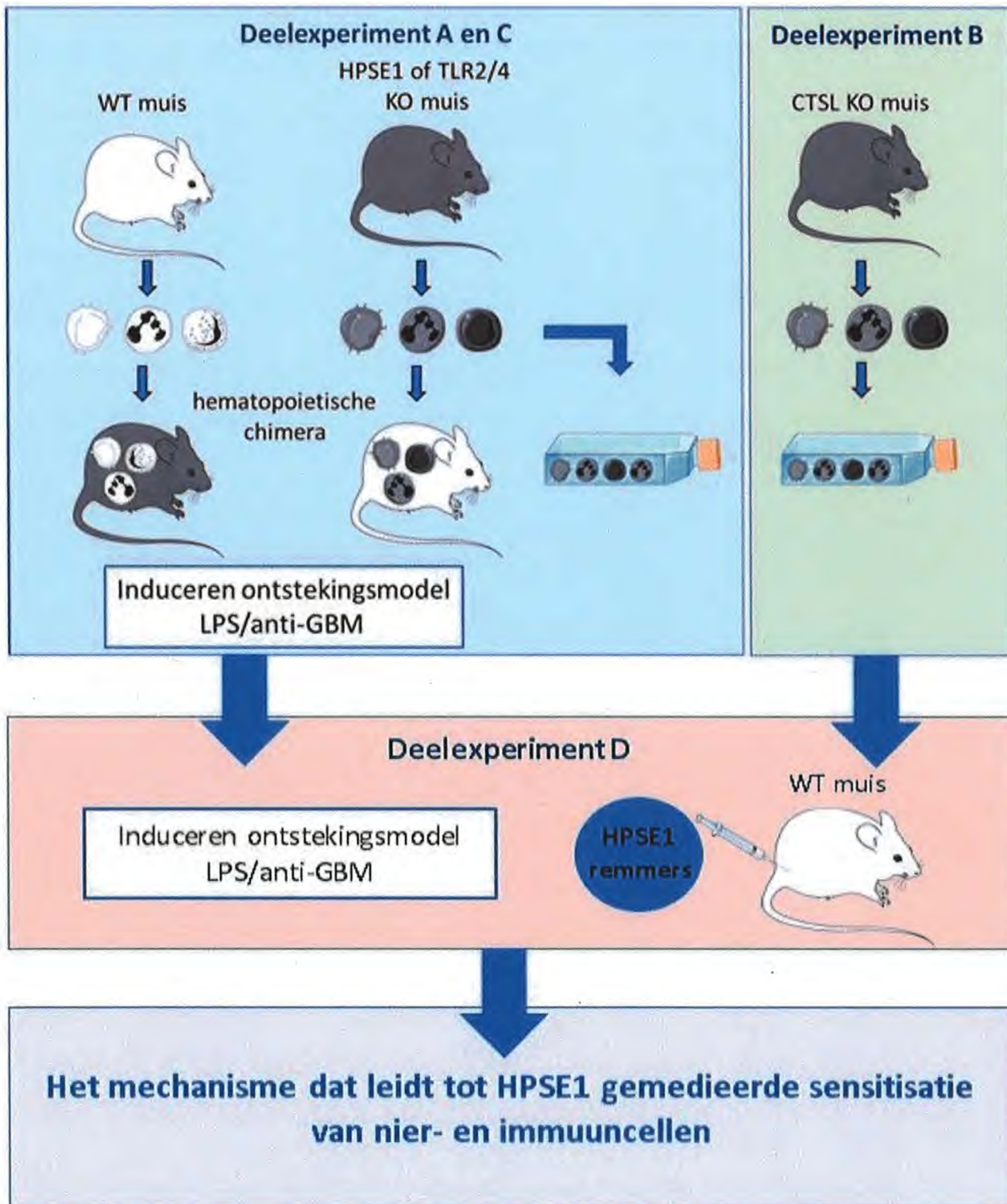
Zoals beschreven in sectie 3.2 is het **hoofddoel** van dit onderzoek inzicht krijgen in de rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde sensitisatie van nier- en immuuncellen in diermodellen voor nierfilterontsteking. Daarnaast zal de verkregen informatie gebruikt worden voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor mogelijke remming van HPSE1 om proteïnurie en nierschade te verminderen en/of te voorkomen. Om onze hoofddoelstelling te behalen, wordt dit project onderverdeeld in vier onderdelen (Figuur 1):

(A) Het bestuderen van de bijdrage van glomerulaire cellen versus immuuncellen in HPSE1 gerelateerde nierfilterontsteking en de rol van endogene HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie. Dit zal worden onderzocht in respectievelijk, muismodellen waarin of wel in de glomerulaire cellen of wel in de immuuncellen HPSE1 genetisch uitgeschakeld is en in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van HPSE1 deficiënte muizen.

(B) Het bestuderen van de rol van CTSL leidend tot enzymatisch actief HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van CTSL deficiënte muizen.

(C) Het bestuderen van de rol van TLR2/4 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie in nierfilterontsteking zowel in muismodellen waarin of wel de glomerulaire cellen of wel de immuuncellen TLR2/4 deficiënt zijn, en in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van TLR2/4 deficiënte muizen.

(D) Het bestuderen van het effect van HPSE1 remming door verschillende systemische behandelingen, en cel-specifieke behandelingen van glomerulaire- en immuuncellen, met HPSE1 remmers in muismodellen voor nierfilterontsteking. De verkregen resultaten zullen ook bijdrage aan een beter begrip van de rol van HPSE1 en HPSE1 remming in glomerulaire- en immuuncellen.



Figuur 1: Flowchart van hoe de verschillende deelexperimenten samen naar het hoofddoel toewerken. WT= wildtype; KO=knock-out

Het induceren van nierfilterontsteking kan op verschillende manieren. In dit onderzoek willen we gebruik maken van het LPS-model en het anti-GBM-model. Beide modellen zijn in de literatuur geaccepteerde modellen voor nierfilterontsteking. Tevens is het ongerief voor beide modellen voor de muizen vergelijkbaar. Echter, zijn er zowel voordelen als nadelen te benoemen voor beide modellen:

Het sublethale LPS geïnduceerde nierfilterontstekingsmodel:

Voordelen:

1. Het LPS-model is een systemisch model waarbij activatie van het immuunsysteem centraal staat, wat van belang zou kunnen zijn in deze studie aangezien we de response van zowel niercellen als immuuncellen bestuderen.
2. Het LPS-model is een model voor milde sepsis die gepaard gaat met ontsteking van de nierfilters en leidt tot nierschade. Sepsis geïnduceerde nierfalen komt zeer vaak voor bij mensen op de IC en is daardoor zeer relevant voor de humane situatie.
3. Het is een kort model (48 uur) waardoor ook tijdens de behandelingen de muizen minder injecties nodig hebben.

Nadelen:

1. Het model kan niet worden uitgevoerd in de experiment C aangezien TLR 2/4 de receptor is voor LPS.

Het anti-GBM-model:**Voordelen:**

1. In tegenstelling tot het LPS-model, is het anti-GBM-model een nierspecifiek model en daardoor kan de data die hiermee wordt verkregen zelfs andere inzichten geven dan het LPS-model.

Nadelen:

1. Voor het induceren van het anti-GBM-model is anti-GBM-konijn IgG nodig waarvoor voor een gemiddelde batch 200 muizen en 20 konijnen benodigd zijn die behalve verschillende injecties ook perfusie moeten ondergaan en daardoor ongerief ondervinden (er is momenteel nog een kleine hoeveelheid anti-GBM-konijn IgG beschikbaar, welke genoeg is voor deze experimenten, echter willen we hier door voorgenoemde redenen zuinig mee zijn).
2. Het anti-GBM model is een complex model waarin 2 fases optreden (eerst een granulocyten influx met een piek bij 2 uur en daaropvolgend nierschade die al waargenomen kan worden na 4 dagen); hierdoor moeten voor het anti-GBM model muizen geofferd moeten worden op meerdere tijdstippen om dezelfde hoeveelheid data te verkrijgen, zijn dus dubbel zo veel muizen nodig voor het anti-GBM-model in vergelijking tot het LPS-model.
3. Doordat het anti-GBM-model 96 uur duurt, zullen de muizen relatief vaak geïnjecteerd moeten worden voor de behandelingen in de experiment D.
4. Ondanks dat anti-GBM nierfilterontsteking voorkomt in mensen, is de incidentie relatief laag (17) in vergelijking met sepsis geïnduceerde nierfilterontsteking (18).

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

In dit project willen we inzicht krijgen in de rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde sensitisatie van nier- en immuuncellen in diersystemen voor nierfilterontsteking. Daarnaast zal de hiervoor benoemde resultaten gebruikt worden in de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor mogelijke remming van HPSE1 om proteïnurie en nierschade te voorkomen. We hebben voor het diersysteem voor nierfilterontsteking gekozen, omdat voor dit model is aangetoond dat HPSE1 activiteit essentieel is voor het ontstaan van proteïnurie en nierschade (6, 7).

In dit project zal worden gestart met **deexperiment A**, waarin we de bijdrage van glomerulaire cellen versus immuuncellen in HPSE1 gerelateerde nierfilterontsteking willen vaststellen door middel van hematopoïetische chimera van wildtype en HPSE1 knockout muizen. Door te wisselen tussen wildtype muizen met beenmergtransplantatie van HPSE1 knockout muizen en HPSE1 knockout muizen met beenmergtransplantatie van wildtype muizen worden respectievelijk, muizen met wildtype glomerulaire cellen en HPSE1 knockout immuuncellen, en muizen met HPSE1 knockout glomerulaire cellen en wildtype immuuncellen gemaakt. Om het beenmerg te verkrijgen zullen zowel wildtype als knockout muizen worden geofferd en het beenmerg verzameld volgens standaardprocedures. De bestraling van de ontvanger muizen en de daaropvolgende beenmergtransplantatie voor het maken van de hematopoïetische chimera's zal circa 1 week voor het introduceren van de nierfilterontsteking volgens standaard protocollen worden uitgevoerd. Door in deze muizen nierfilterontsteking te induceren door middel van LPS i.p of anti-GBM konijn IgG i.v injectie kan vervolgens de bijdrage van HPSE1, afkomstig van glomerulaire- en immuuncellen, aan

proteïnurie en nierschade worden vastgesteld. Muizen zullen worden geofferd 48 uur na LPS injectie en 2 uur en 4 dagen na anti-GBM konijn IgG injectie.

Verder willen we de bijdrage van endogeen HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie van immuuncellen bestuderen. Dit zal worden gedaan door de immuuncellen van de HPSE1 knockout muizen te onderzoeken. Uit beenmergcellen zullen *ex vivo* neutrofielen worden geïsoleerd en de beenmergcellen kunnen worden gedifferentieerd naar verschillende type macrofagen en dendritische cellen. Vervolgens zullen al deze cellen worden gesensitiseerd met recombinant HPSE1 en daaropvolgend een andere stimuli zoals TNF α of LPS ontvangen. Aangezien beschreven is dat uit beenmergcellen gedifferentieerde macrofagen minder gevoelig kunnen zijn voor stimuli in vergelijking met mature macrofagen in perifere weefsels en het fenotype van de verschillende macrofagen ook anders is (19), willen we ook peritoneale macrofagen testen. Peritoneale macrofagen worden verkregen door een eenmalige injectie i.p. met thioglycolaat waarna na 3-4 dagen de muizen worden geofferd en de immuuncellen worden verkregen door een buikspoeling met fysiologisch zout. De resultaten van deze experimenten zullen worden vergeleken met *ex vivo* resultaten van deelexperiment B en deelexperiment C.

Voor **deelexperiment B**, waarin we de rol van CTSL leidend tot actief HPSE1 willen onderzoeken in HPSE1 gemedieerde sensitisatie zal alleen gekeken worden naar de immuuncellen van de CTSL knockout muizen. Zoals beschreven in deelexperiment A zullen de beenmergcellen van CTSL deficiënte muizen *ex vivo* worden gedifferentieerd tot macrofagen en gesensitiseerd met recombinant HPSE1. Aangezien beschreven is dat uit beenmergcellen gedifferentieerde macrofagen minder gevoelig kunnen zijn voor stimuli in vergelijking met mature macrofagen in perifere weefsels, willen we ook peritoneale macrofagen testen. Peritoneale macrofagen worden verkregen door een eenmalige injectie i.p. met thioglycolaat waarna na 3-4 dagen de muizen worden geofferd en de immuuncellen worden verkregen door een buikspoeling met fysiologisch zout. De resultaten van deze experimenten zullen worden vergeleken met *ex vivo* resultaten van deelexperiment A en deelexperiment C.

Voor deelexperiment B moet een fok met ongerief worden gestart, waarover in het verleden toestemming is verleend. Momenteel worden de muizen in stand gehouden als heterozygote fok.

Voor **deelexperiment C**, waarin we de rol willen onderzoeken van TLR2/4 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie in nierfilterontsteking zal gebruik worden gemaakt van zowel muismodellen waarin of wel in de glomerulaire cellen of wel in de immuuncellen TLR2/4 genetisch uitgeschakeld zijn als *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van TLR2/4 deficiënte muizen. Net als beschreven voor deelexperiment A zullen hematopoietische chimeras worden gemaakt van wildtype en TLR2/4 knockout muizen om respectievelijk, muizen met wildtype glomerulaire cellen en TLR2/4 knockout immuuncellen, en muizen met TLR2/4 knockout glomerulaire cellen en wildtype immuuncellen te krijgen. Verder zal in deze muizen nierfilterontsteking worden geïnduceerd door middel van anti-GBM i.p injectie zoals beschreven onder deelexperiment A. Tevens zullen de muizen worden geofferd 2 uur en 4 dagen na anti-GBM konijnserum injectie. De resultaten van deze experimenten zullen worden vergeleken met de *in vivo* resultaten van deelexperiment A.

Verder willen we de bijdrage van TLR2/4 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie van immuuncellen bestuderen. Dit zal worden gedaan door naar de immuuncellen van de TLR2/4 dubbel knockout muizen te kijken. Zoals beschreven bij deelexperiment A zullen de van de beenmergcellen *ex vivo* neutrofielen worden geïsoleerd en deze beenmergcellen kunnen worden gedifferentieerd verschillende immuuncellen waaronder verschillende type macrofagen en dendritische cellen. Vervolgens zullen al deze cellen worden gesensitiseerd met recombinant HPSE1 en daaropvolgend een andere stimuli zoals TNF α of LPS ontvangen. Aangezien beschreven is dat uit beenmergcellen gedifferentieerde macrofagen minder gevoelig kunnen zijn voor stimuli in vergelijking met mature macrofagen in perifere weefsels, willen we ook peritoneale macrofagen testen. Peritoneale macrofagen worden verkregen door een eenmalige injectie i.p. met thioglycolaat waarna na 3-4 dagen de muizen worden geofferd en de macrofagen worden verkregen door een buikspoeling met fysiologisch zout. De resultaten van deze experimenten zullen worden vergeleken met *ex vivo* resultaten van deelexperiment A en deelexperiment B.

Voor **deelexperiment D**, waarin we het effect van systemische behandeling of cel-specifieke behandeling in glomerulaire- en immuuncellen met HPSE1 remmers in diermodellen voor nierfilterontsteking willen bestuderen, zal gebruik worden gemaakt van wildtype muizen. Deze

wildtype muizen zullen worden behandeld met systemische HPSE1 inhibitors zoals sulodexide en GAG formulaties, of nierspecifiek met HPSE2 eiwit/peptide/RNA. Alleen de 2 meest potente GAG formulaties op basis van onze *in vitro* testen zullen systemisch worden geïnjecteerd. Om nier-specifieke of immuuncel-specifieke behandeling te bereiken, zullen muizen worden behandeld met nanoparticles die gericht worden op glomerulaire cellen of immuuncellen. Deze nanoparticles zullen HPSE2 peptides/eiwit/of RNA bevatten.

Voor zowel de cel-specifieke behandelingen met HPSE2 eiwit/peptide/RNA als de systemische behandelingen met GAG formulaties zullen we eerst pilots doen met kleinere groepen muizen om op basis daarvan de juiste concentratie te bepalen voor het behandelen van een grotere groep muizen

Nierfilterontsteking zal worden geïnduceerd door middel van LPS injectie of anti-GBM konijnserum injectie zoals beschreven onder deexperiment A. Tevens zullen de muizen worden geofferd 48 uur na LPS injectie, en 2 uur en 4 dagen na anti-GBM injectie.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project.

If applicable, describe the milestones and selection points

Deelexperiment A: Allereerst wordt doormiddel van hematopoietische chimera's van wildtype en HPSE1 knockout dieren bepaald wat de bijdrage is van HPSE1 in glomerulaire cellen en immuuncellen in nierfilterontsteking.

Decision point: We zullen beginnen met het LPS model om nierfilterontsteking te induceren in de muizen. Mocht dit model geen eenduidige resultaten opleveren, dan zullen we alsnog het anti-GBM model toepassen om nierfilterontsteking te induceren. Het anti-GBM model is nierspecifiek maar ook veel kostbaarder gezien het gebruik van anti-GBM konijn IgG waarvoor voor een gemiddelde batch 200 muizen en 20 konijnen benodigd zijn die behalve verschillende injecties ook perfusie moeten ondergaan en daardoor ongerief ondervinden (er is momenteel nog een kleine hoeveelheid anti-GBM konijn IgG beschikbaar, echter willen we hier door voorgenoemde redenen zuinig mee zijn). Indien genoeg en eenduidige informatie kan worden verkregen om met het LPS-model tot een conclusie te kunnen komen met betrekking tot de onderzoeksvraag, dan zal het anti-GBM-model niet meer worden uitgevoerd.

Verder zullen voor deexperiment A *ex vivo* experimenten worden uitgevoerd om de rol van endogene HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie van immuuncellen te onderzoeken. Dit zal ook worden gedaan in deexperiment B voor CTSL en deexperiment C voor TLR2/4. Verwacht wordt dat HPSE1 gemedieerde sensitisatie ook *in vivo* plaats vindt. Deze *in vivo* HPSE gemedieerde sensitisatie zal worden bestudeerd door de immuuncellen en niercellen te analyseren van knock-out/chimera knock-out versus wild-type muizen (ondermeer door het bestuderen van de *in vivo* response en HS-expressie) en deze resultaten te vergelijken met de data uit de *ex vivo* sensitisatie experimenten. Samen zullen de *ex vivo* en *in vivo* resultaten van deexperiment A, B en C een beter inzicht geven in het mechanisme van HPSE1 gemedieerde sensitisatie.

Decision point: Indien sensitisatie van beenmergcellen niet kan worden aangetoond in een initiële *ex vivo* pilot experimenten, zullen vervolgens niet alle muizen worden geofferd om beenmerg te verkrijgen. In dit geval zal enkel verder worden gegaan met peritoneale macrofagen.

Deelexperiment B: Er zal een fok zal worden opgezet om CTSL $-/-$ muizen te krijgen. Momenteel wordt de fok in stand gehouden door $+/-$ muizen. De fok willen we starten door $+/-$ vrouwen te kruisen met $-/-$ mannen en $+/-$ mannen. Dit omdat de CTSL $+/-$ vrouwen betere moeders zouden zijn dan de CTSL $-/-$ vrouwen. De gefokte $-/-$ muizen zullen worden gebruikt om de *ex vivo* sensitisatie experimenten mee uit te voeren. Deze experimenten zullen worden uitgevoerd in overeenstemming met de *ex vivo* experimenten van deexperiment A en C en kunnen daarom worden vergeleken met elkaar.

Decision point: Indien sensitisatie van beenmergcellen niet kan worden aangetoond in een initiële *ex vivo* pilot experimenten, zullen vervolgens niet alle muizen worden geofferd om beenmerg te verkrijgen. In dit geval zal enkel verder worden gegaan met peritoneale macrofagen.

Deelexperiment C: Vervolgens wordt doormiddel van hematopoietische chimera's van wildtype en TLR2/4 dubbel knockout dieren bepaald wat de bijdrage is van TLR2/4 in glomerulaire cellen en immuuncellen in nierfilterontsteking. In deexperiment C zal alleen het anti-GBM model worden gebruikt aangezien het LPS model niet kan worden gebruik in TLR2/4 knockout muizen aangezien

TLR2/4 de target is voor LPS en hierdoor het experiment niet de beoogde resultaten zal geven. Desondanks kunnen de resultaten van de *in vivo* experimenten van deelexperiment A en C worden vergeleken.

Verder zullen voor deelexperiment C *ex vivo* experimenten worden uitgevoerd om de rol van TLR2/4 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie van immuuncellen te onderzoeken. Aangezien dit ook zal worden gedaan in deelexperiment A voor HPSE1 en deelexperiment B voor CTSL kunnen de *ex vivo* resultaten van deelexperiment A, B en C samen een beter inzicht geven in het mechanisme van HPSE1 gemedieerde sensitisatie.

Decision point: Indien sensitisatie van beenmergcellen niet kan worden aangetoond in een initiële *ex vivo* pilot experimenten, zullen vervolgens niet alle muizen worden geofferd om beenmerg te verkrijgen. In dit geval zal enkel verder worden gegaan met peritoneale macrofagen.

Decision point: De informatie verkregen in deelexperimenten A en C kunnen een indicatie geven over een effectieve behandeling door cel-specifieke HPSE1 remming. Mochten deelexperiment A en C aantonen dat cel-specifieke behandeling van alleen glomerulaire cellen of alleen immuuncellen een verbetering geeft in het nierfilterontstekings model, dan zal cel-specifieke behandeling van slechts deze cel types worden uitgevoerd in deelexperiment D.

Deelexperiment D: Ten slotte zullen wildtype dieren verschillende systemische behandelingen, en cel-specifieke behandelingen in glomerulaire- of immuuncellen, met HPSE1 remmers ontvangen in diermodellen voor nierfilterontsteking.

Decision point: We zullen beginnen met het LPS model om nierfilterontsteking te induceren in de muizen. Mocht de pilot van dit model geen eenduidige resultaten opleveren, dan zullen we alsnog beginnen met de pilot van het anti-GBM model toepassen om nierfilterontsteking te induceren. Op basis van de data verkregen met de pilot-experimenten en de eerdere deelexperimenten zullen we bepalen met welk model we verder gaan. Het anti-GBM model is nierspecifiek maar ook veel kostbaarder gezien het gebruik van anti-GBM konijn IgG waarvoor voor een gemiddelde batch 200 muizen en 20 konijnen benodigd zijn die behalve verschillende injecties ook perfusie moeten ondergaan en daardoor ongerief ondervinden (er is momenteel nog een kleine hoeveelheid anti-GBM konijn IgG beschikbaar, echter willen we hier door voorgenoemde redenen zuinig mee zijn). Indien genoeg en eenduidige informatie kan worden verkregen om met het LPS-model tot een conclusie te kunnen komen met betrekking tot de onderzoeksvraag, dan zal het anti-GBM-model niet meer worden uitgevoerd.

De data verkregen van deelexperiment A (speelt HPSE1 vooral een rol in glomerulaire cellen of niercellen of beide?), deelexperiment B (is enzymatisch actief HPSE1 benodigd voor de HPSE1 gemedieerde sensitisatie?), deelexperiment C (speelt TLR2/4 vooral een rol in glomerulaire cellen of niercellen of beide? En wat is de rol in HPSE1 gemedieerde sensitisatie?) en deelexperiment D (het effect van celspecifieke remming van niercellen of immuuncellen versus systemische remming van HPSE1) geven samen een beter inzicht in de bijdrage/rol en het onderliggende mechanisme van de rol van glomerulaire- en immuuncellen in HPSE1 gemedieerde nierfilterontsteking.

Referenties:

1. Tryggvason K, Pettersson E. Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *Journal of Internal Medicine*. 2003;254(3):216-24.
2. van den Born J, van den Heuvel LP, Bakker MA, Veerkamp JH, Assmann KJ, Weening JJ, et al. Distribution of GBM heparan sulfate proteoglycan core protein and side chains in human glomerular diseases. *Kidney Int*. 1993;43(2):454-63.
3. 10.2 .e. en g
4. 10.2 .e. en g
5. 10.2 .e. en g
6. 10.2 .e. en g

10.2 .e. en g

7. 10.2 .e. en g

8. You H, Gao T, Cooper TK, Brian Reeves W, Awad AS. Macrophages directly mediate diabetic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305(12):F1719-27.

9. Cao Q, Harris DC, Wang Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. *Physiology (Bethesda)*. 2015;30(3):183-94.

10. Goldberg R, Sonnenblick A, Hermano E, Hamburger T, Meirovitz A, Peretz T, et al. Heparanase augments insulin receptor signaling in breast carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(12):19403-12.

11. 10.2 .e. en g

12. Blich M, Golan A, Arvatz G, Sebbag A, Shafat I, Sabo E, et al. Macrophage activation by heparanase is mediated by TLR-2 and TLR-4 and associates with plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(2):e56-e65.

13. Goodall KJ, Poon IKH, Phipps S, Hulett MD. Soluble Heparan Sulfate Fragments Generated by Heparanase Trigger the Release of Pro-Inflammatory Cytokines through TLR-4. *PLOS ONE*. 2014;9(10):e109596.

14. 10.2 .e. en g

15. Levy-Adam F, Feld S, Cohen-Kaplan V, Shteingauz A, Gross M, Arvatz G, et al. Heparanase 2 interacts with heparan sulfate with high affinity and inhibits heparanase activity. *J Biol Chem*. 2010;285(36):28010-9.

16. Kiyani Y, Tkachuk S, Kurselis K, Shushakova N, Stahl K, Dawodu D, et al. Heparanase-2 protects from LPS-mediated endothelial injury by inhibiting TLR4 signalling. *Scientific Reports*. 2019;9(1):13591.

17. McAdoo SP, Pusey CD. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(7):1162-72.

18. Poston JT, Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury. *BMJ*. 2019;364:k4891-k.

19. Bisgaard LS, Mogensen CK, Rosendahl A, Cucak H, Nielsen LB, Rasmussen SE, et al. Bone marrow-derived and peritoneal macrophages have different inflammatory response to oxLDL and M1/M2 marker expression – implications for atherosclerosis research. *Scientific Reports*. 2016;6(1):35234.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Deelexperiment A
2	Deelexperiment B
3	Deelexperiment C
4	Deelexperiment D

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD10300 2021 14613 / 2021-0006
2. Titel van het project: De rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 (voorheen: Heparanase: a double-edged sword in the development of glomerulonephritis)
3. Titel van de NTS: De rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 04-03-2021
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 09-03-2021
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 15-03-2021 tot 23-03-2021 / 09-04-2021 (de beantwoording in eerste instantie was niet toereikend, waardoor enkele vragen ter verduidelijking zijn gesteld)
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 23-03-2021 / 09-04 -2021
 - advies aan CCD: 26-04-2021
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 15-03-2021
 - Datum antwoorden: 23-03-2021
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-1: De titel roept vooral vragen op, en is weinig informatief. Uit de aanvraag wordt niet duidelijk wat wordt bedoeld met 'tweesnijdend zwaard'.

Antwoord: We zijn ermee eens dat de titel inderdaad duidelijker zou kunnen. Daarom hebben we de titel aangepast naar: De rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1.

-3.1: Een duidelijke introductie van de diermodellen ontbreekt nog. De commissie kan niet goed navolgen waarom u juist deze modellen voor nierontsteking heeft uitgekozen in relatie tot het uiteindelijke doel van dit (translationele) onderzoek. In de DAP wordt gesteld dat het LPS-model het meest voorkomt bij mensen, maar een onderbouwing van deze bewering (en wat u hier precies mee bedoelt) ontbreekt.

Ook in de strategiebeschrijving zouden voor- en nadelen van beide diermodellen duidelijk aan bod moeten komen. De commissie wil daarbij opmerken dat zij primair belang hecht aan validiteit van de gebruikte modellen en aan dierenwelzijn/verfijning, in mindere mate aan economische motieven.

Antwoord: Om de diermodellen beter te introduceren is een paragraaf opgenomen met uitleg van de diermodellen en een betere onderbouwing over waarom deze diermodellen gekozen zijn. Tevens zijn de voors en tegens benoemd voor ieder diermodel.

-3.1: Een schema / graphical abstract met alle elementen van de moleculaire mechanismen die onderzocht zullen worden (CathepsinL, TLR2/4 etc.) inclusief de rol van de ex vivo experimenten daarin zou verhelderend zijn.

Antwoord: Een graphical abstract met alle elementen van de moleculaire mechanismen is hier toegevoegd. De zwarte receptor is hierin TLR2/4. De witte ketens zijn heparan sulfaten die worden afgebroken door HPSE1 na activatie door CTSL. Zoals kan worden gezien in de afbeelding kunnen wanneer de heparan sulfaatketens zijn weggehaald van het celoppervlak de cellen worden gesensitiseerd, ondermeer door het binden van heparan sulfaat fragmenten aan TLR2/4. Verder spelen activatie door cytokines ook een rol (welke eveneens zal worden onderzocht in de ex vivo experimenten). Tevens worden hierin de verschillende cellen (niercellen en de immuuncellen) die een rol spelen in de secretie/activatie van HPSE 1 en dus deze projectaanvraag genoemd.

-3.4.2: Waarom worden twee diermodellen voor nierfilterontsteking onderzocht bij deelexperiment A en D? Graag helder presenteren wat voor- en nadelen van de twee ontstekingsmodellen zijn. In de bijlage vermeldt u dat er weinig mensen zijn met anti-GBM antistoffen, maar het gaat er vooral om of de ontsteking/de ziekte die u op deze manier induceert een grote mate van overeenkomst vertoont met de ontsteking/het ziekteverloop bij mensen (externe validiteit). De commissie meent dat systemische LPS-toediening allerlei bijeffecten heeft die niet nier-specifiek zijn, maar mogelijk wel interfereren met de processen en parameters die u zult onderzoeken; te denken valt aan activering van het immuunsysteem en de gevolgen daarvan. Een ander model dat langzamer op gang komt en milder is voor de dieren zou een verfijning voor de dieren zijn en heeft mogelijk meer externe validiteit. Met andere woorden, uw acute diermodel lijkt minder relevant voor translatie van de resultaten naar patiënten, en sepsis is een heftig ziektebeeld met aanzienlijk ongerief voor en uitval van dieren. De commissie verzoekt u de noodzaak voor het gebruik van dit model te heroverwegen en, indien u besluit dat dit toch het meest valide model is en verdere verfijning niet mogelijk, beter te onderbouwen dat dit model absoluut noodzakelijk is voor het behalen van uw onderzoeksdoelen en bovenstaande opmerkingen en vragen van de commissie daarbij te adresseren.

Antwoord: We begrijpen de vragen omtrent het gebruik van de twee verschillende ziektemodellen. We hebben de gevraagde voors en tegens van beide muismodellen genoemd in de strategie beschrijving. Tevens zullen we graag ingaan op de vragen van de commissie. Het is inderdaad correct dat het LPS-model systemisch is en daardoor het immuunsysteem activeert. Echter, gezien het feit dat we in dit onderzoek willen kijken wat de rol is van de niercellen versus de immuuncellen met betrekking tot HPSE1, zou dit juist een voordeel kunnen zijn van het LPS-model. Tevens is het zo dat ook in het anti-GBM-model het immuunsysteem wordt geactiveerd, maar dan in mindere mate en lokaal. Samenvattend,

verwachten wij niet dat de systemische bijwerkingen van het LPS-model zullen interfereren met ons onderzoek, maar eerder zullen bijdragen. Verder willen we graag benadrukken dat wat betreft ongerief het anti-GBM en het sublethale LPS geïnduceerde nierfilterontsteking model vergelijkbaar zijn.

Wat betreft de externe validiteit van het LPS-model versus het anti-GBM-model zijn zij beide even relevant aangezien beide modellen de meest belangrijke karakteristieken vertonen die behoren bij nierfilterontsteking, wat is toegevoegd in de introductie:

Het induceren van nierfilterontsteking kan op verschillende manieren. Aangezien nierfilterontsteking bij mensen gekarakteriseerd wordt door de influx van immuun cellen, proteïnurie en verslechterde nierfunctie zijn dit belangrijke symptomen die aanwezig moeten zijn in het ziektemodel. In dit onderzoek willen we daarom gebruik maken van het LPS-model en het anti-GBM-model.

-3.4: Uit de informatie in DAP4 blijkt dat u de sensitisatie van cellen (deels?) ook zult onderzoeken met de *in vivo* experimenten. Kunt u het verband tussen (de vergelijking van) de resultaten van de verschillende *ex vivo* deel experimenten en de vraagstelling helderder opschrijven? De beschrijving van deze experimenten is ook in de DAPs erg summier, waardoor het lastig is na te volgen hoe deze experimenten bijdragen aan het inzicht dat u beoogt. Ook wordt niet toegelicht waarom u daar zowel beenmergcellen als peritoneale macrofagen voor nodig heeft, terwijl dit wel consequenties heeft voor het aantal benodigde dieren en bijkomend ongerief. Wellicht zou u daar al een keuze in kunnen maken op grond van een pilotexperiment? Dergelijke strategische keuzes zouden in dit onderdeel helder toegelicht moeten worden.

Antwoord: het verband tussen (de vergelijking van) de resultaten van de verschillende ex vivo deel experimenten en de vraagstelling zijn helderder opgeschreven in 3.4.3:

Verwacht wordt dat HPSE1 gemedieerde sensitisatie ook in vivo plaats vindt. Deze in vivo HPSE gemedieerde sensitisatie zal worden bestudeerd door de immuun cellen en nier cellen te analyseren van knock-out/chimera knock-out versus wild-type muizen (ondermeer door het bestuderen van de in vivo response en HS-expressie) en deze resultaten te vergelijken met de data uit de ex vivo sensitisatie experimenten. Samen zullen de ex vivo en in vivo resultaten van deelexperiment A, B en C een beter inzicht geven in het mechanisme van HPSE1 gemedieerde sensitisatie.

Verder is er toegelicht waarom er zowel beenmergcellen als peritoneale macrofagen gebruikt zullen worden:

Uit beenmergcellen zullen ex vivo neutrofielen worden geïsoleerd en de beenmergcellen kunnen worden gedifferentieerd naar verschillende type macrofagen en dendritische cellen. Vervolgens zullen al deze cellen worden gesensitiseerd met recombinant HPSE1 en daaropvolgend een andere stimuli zoals TNF α of LPS ontvangen. Aangezien beschreven is dat uit beenmergcellen gedifferentieerde macrofagen minder gevoelig kunnen zijn voor stimuli in vergelijking met mature macrofagen in perifere weefsels en het fenotype van de verschillende macrofagen ook anders is (19), willen we ook peritoneale macrofagen testen. Samenvattend kunnen we vanuit de beenmergcellen verschillende soorten cellen verkrijgen/differentiëren, wat de relevantie groter maakt. Echter, zoals aangegeven is specifiek voor macrofagen, de peritoneale macrofagen een gevoeliger celtype. Tevens is de HPSE1 gemedieerde sensitisatie in wild-type peritoneale macrofagen aangetoond en nog niet in beenmerg gedifferentieerde macrofagen.

Description of Animal Procedures:

*DAP1

-A1: Als primaire uitleesparameter voor cellulaire sensitatisie wordt genoemd 'HPSE1 gemedieerde sensitatisie na ex vivo incubatie etc.' Dit is geen primaire uitleesparameter, maar de omschrijving van het ex vivo experiment. Wat wordt er gemeten in dat experiment?

Antwoord: Om duidelijk te beschrijven wat er precies gemeten zal worden in de ex vivo sensitatisie experimenten is het volgende toegevoegd:

Ex vivo HPSE1 gemedieerde sensitatisie:

Pre-incubatie van immuun cellen zoals neutrofielen en macrofagen met recombinant HPSE1 (eventueel ook met HS) gevolgd door een tweede stimulus zoals TNF- α of LPS. Vervolgens zal gemeten worden:

- Activatie markers met IF en flow cytometrie
- mRNA expressie waarden van ontstekingsmarkers
- Cytokine response met ELISA
- HS-expressie op het cel oppervlak

-A2: Dit project richt zich op het voorkomen van nierschade. Is het strikt noodzakelijk om voor alle groepen bij het anti-GBM-model een extra tijdstip te hanteren voor het meten van granulocyten en macrofagen influx (2 uur)? Hierdoor zijn tweemaal zoveel dieren nodig (en tweemaal zoveel van het dure/zeldzame antilichaam?). Waarom is dit 2 uur tijdstip bij het LPS-model niet nodig?

Antwoord: In tegenstelling tot wat wordt gesuggereerd richt dit project zich niet enkel op nierschade. Nierschade is natuurlijk een grote speler en een van de grootste uitleesparameters. Echter, in dit project willen we onderzoeken wat de relatieve bijdrage is van nier cellen versus immuun cellen met betrekking tot HPSE1. Het is daardoor ook van belang om te kunnen bestuderen hoe het immuunsysteem reageert. Gezien het anti-GBM model bestaat uit 2 fases: de eerste fase gaat gepaard met granulocyten influx welke piekt bij 2 uur en in de tweede fase ontstaat nierschade welke al na 96 uur meetbaar is. Voor het LPS-model is dit niet nodig aangezien bij 48 uur voldoende informatie kan worden verkregen met betrekking tot immuun cel influx in de nier.

-D2: Dieren worden in IVC kooien gehuisvest om infecties te voorkomen (en ze krijgen antibiotica om eventuele infecties te bestrijden). De IVC-bakken hangen in rekken, en kunnen daarom niet op een warmtemat gezet worden (nadat de dieren een sublethale dosis LPS of anti-GBM serum hebben gekregen). Hoe zult u zorgen voor een warme plek in de kooien? Daarnaast is niet duidelijk of het voorkomen van infecties geen rol meer speelt bij de huisvesting in metabole kooien. Graag toelichten.

Antwoord: Bedankt voor het opmerken dat het niet mogelijk is om de kooi te verwarmen aangezien de IVC bakken in rekken hangen. Echter, er wordt verwacht dat de muizen wanneer het ziekte model wordt gestart voldoende hersteld zijn van de beenmergtransplantatie en het dan niet meer nodig is om de muizen in IVC bakken te huisvesten. Na overleg met de IvD is besloten dat indien het toch nodig blijkt om de dieren tijdens de behandeling in IVC bakken te huisvesten, dat de IVC bakken tijdelijk (in de meest kritische periode) op warmte matten geplaatst worden.

Met betrekking tot de metabole kooien: Hierbij is het voorkomen van infecties niet meer van belang aangezien de muizen dan al volledig hersteld zijn van de beenmergtransplantatie.

-H: Er is nee aangekruist op de vraag of dieren pijn zullen hebben, maar de commissie vermoedt dat met name de dieren in het LPS-model wel pijn zullen ervaren. Er is vervolgens wel aangekruist dat er pijnbestrijding wordt toegepast, maar een beschrijving van verlichtende methoden en maatregelen ontbreekt. Graag een helder en consistent antwoord op de vragen van dit onderdeel.

Antwoord: In overleg met de IvD hadden we besloten dat de dieren geen pijn zullen ondervinden. De dieren zullen dus ook geen pijnbestrijding krijgen. Echter, voordat het document naar IvD was gestuurd, hadden we wel pijnbestrijding ingevuld. Helaas blijft dit nu na aanpassing onduidelijk in iventionless staan.

-J: Bij A ontbreekt het wegen van de dieren, terwijl er wel een humaan eindpunt op basis van het gewicht van de dieren is geformuleerd. Graag opschrijven wanneer de dieren gewogen worden.

De totaalscore die wordt gehanteerd voor het toepassen van een humaan eindpunt lijkt vrij hoog. Kunt u toelichten waarom het nodig is om dieren met score 4 nog in het experiment te laten? Criteria voor humane eindpunten kunnen zodanig aangepast worden dat onnodig ongerief voor de dieren wordt vermeden.

Antwoord: Het wegen van de muizen is toegevoegd bij A.

Met betrekking tot de totaalscore die gehanteerd wordt in de humane eindpunten, is dit de standaard criteria voor humane eindpunten die wij toepassen bij dierexperimenten en in de afgelopen jaren altijd gebruikt hebben in onze DEC aanvragen na overleg met de IvD. Verondersteld wordt dat de muizen met een totaalscore van 4 nog niet het humane eindpunt hebben bereikt.

-K: Is het cumulatief ongerief goed ingeschat voor dieren die beenmergtransplantatie + LPS krijgen? Zijn de dieren nog niet volledig hersteld van de beenmergtransplantatie op het moment van de LPS-injectie, waardoor de impact daarvan groter is bij deze dieren (ten opzichte van dieren zonder beenmergtransplantatie)? Het ondergaan van twee handelingen die elk matig ongerief veroorzaken (en veel hersteltijd daartussen) leidt niet automatisch tot ernstig ongerief voor de dieren. Graag in overleg met de IvD opnieuw inschatten.

Antwoord: In overleg met de IvD is besloten dat de muizen inderdaad voldoende hersteld zullen zijn van de beenmergtransplantatie dus dat het cumulatief ongerief daardoor lager zal zijn.

*DAP2

- De commissie verzoekt u na te gaan welke vragen en opmerkingen over DAP1 (of de strekking daarvan) ook relevant zijn voor deze DAP en die te beantwoorden.

Aanpassingen uit andere DAPs die betrekking hebben op deze DAP zijn identiek aangepast.

-A: Zijn de bovenste drie primaire uitleesparameters van toepassing op deze DAP?

Antwoord: Excuses, de uitleesparameters waren niet duidelijk beschreven. Dit is aangepast:

Pre-incubatie van immuun cellen zoals neutrofielen en macrofagen met recombinant HPSE1 (eventueel ook met HS) gevolgd door een tweede stimulus zoals TNF- α of LPS. Vervolgens zal gemeten worden:

- Activatie markers met IF en flow cytometrie
- mRNA expressie waarden van ontstekingsmarkers
- Cytokine response met ELISA
- HS-expressie op het cel oppervlak

-B: Zou u de berekeningen van de benodigde aantallen dieren en het aantal dieren met ongerief dat u hier dient te vermelden willen controleren? Om 112 dieren over te houden bij 20% uitval heeft u niet 134 dieren maar 140 dieren nodig; $80 + 134 = 214$ (ipv 114). Graag in samenspraak met de IvD bepalen welke dieren hier geteld moeten worden.

Antwoord: In overleg met de IvD was besloten dat alle muizen die benodigd zijn voor de fok geteld moeten worden aangezien deze DAP een fok met ongerief betreft. De berekeningen zijn aangepast en verder doorgevoerd op andere plaatsen zoals het totaal aantal dieren in de NTS:

Aangezien er verwacht wordt dat er maximaal 20% uitval zal zijn, zullen er dus maximaal $1.25 \times (80+112) = 240$ muizen nodig zijn.

Daarom vragen wij 240 muizen aan voor de fok waarvan 48 muizen zullen worden gebruikt in experimenten.

-I: Kunt u het verloop van de afwijkingen in de tijd duidelijker omschrijven? De commissie kan het ongerief voor de dieren nu niet goed navolgen. Er zullen ook dieren van 8-10 weken oud worden gebruikt, maar in hoeverre zij al last kunnen hebben van ontstekingen is onduidelijk.

Antwoord: Het verloop van de afwijkingen in de tijd is duidelijker beschreven in de DAP.

-I3: Wanneer de dieren ontstekingen hebben ontwikkeld is het te laat om preventieve maatregelen te nemen. Het zou wellicht beter zijn om de dieren preventief in IVC-bakken te huisvesten.

Antwoord: Met betrekking tot de huisvesting preventief in IVC-bakken, dit is inderdaad de bedoeling. Dit is nu duidelijker verwoord in de DAP.

-J: De overige tekst van deze DAP wekt de indruk dat de dieren niet zo oud zullen worden dat er oogproblemen zullen ontstaan. Bij welk percentage van de dieren verwacht u een humaan eindpunt te moeten toepassen (dus exclusief de dieren die overlijden voor het spenen)?

Antwoord: Exclusief de dieren die overlijden voor het spenen verwachten we dat bijna geen muizen (tussen de 0-1%) het humane eindpunt bereiken op basis van onze eerdere onderzoeken.

-K: Het ongerief voor al dan niet blinde dieren met vertroebelde en/of ontstoken ogen of met bloederige plekken/wonden op de huid (de geformuleerde humane eindpunten) lijkt eerder matig dan licht. Hoe kunt u garanderen dat dieren uit de proef gehaald worden voordat het ongerief matig wordt? Indien de dieren lang blijven zitten waardoor zij meer ongerief krijgen, dan graag uitleggen waarom u dat nodig acht.

Antwoord: Mochten de muizen zover komen dan zal dit ongerief inderdaad onder matig kunnen vallen. Echter, gaan wij ervanuit dat vrijwel geen van de muizen deze symptomen zo ernstig zal ontwikkelen binnen 8 tot 10 weken en daardoor hebben we het ongerief ingeschaald als licht. Ervanuit gaande dat minder dan 1% van de dieren wellicht wel dit ongerief zullen ondergaan, hebben we dit nu aangepast in de DAP.

*DAP3

- De commissie verzoekt u na te gaan welke vragen en opmerkingen over DAP1 (of de strekking daarvan) ook relevant zijn voor deze DAP en die te beantwoorden.

Aanpassingen uit andere DAPs die betrekking hebben op deze DAP zijn identiek aangepast.

- Heeft u voldoende anti-GBM serum om alle in deze projectaanvraag beschreven experimenten uit te voeren? Er worden geen dieren aangevraagd om meer anti-GBM serum te produceren.

Antwoord: Er is momenteel nog voldoende anti-GBM-konijnserum voor de deelexperimenten waarbij anti-GBM noodzakelijk is (deelexperiment C en het pilot experiment van deelexperiment D).

*DAP4

- De commissie verzoekt u na te gaan welke vragen en opmerkingen over DAP1 (of de strekking daarvan) ook relevant zijn voor deze DAP en die te beantwoorden.

Antwoord: Aanpassingen uit andere DAPs die betrekking hebben op deze DAP zijn identiek aangepast.

-A2: Het lijkt alsof u van plan bent beide nierfilterontstekingsmodellen in te zetten, ongeacht de resultaten met het LPS-model (hoewel bij de opsomming van de deelgroepen het anti-GBM-model optioneel wordt genoemd). De commissie gaat er vanuit dat de keuze voor het model al is gemaakt na het uitvoeren van de experimenten van DAP1. Graag de aantallen dieren bij B aanpassen, aangezien u nooit beide modellen zult uitvoeren maar daar bij de berekening van de aantallen dieren wel rekening mee houdt.

Antwoord: Aangezien wij niet 1 van de 2 ziektemodellen bij voorbaat volledig willen uitsluiten, maar inderdaad niet van plan zijn om beide ziektemodellen volledig te doen, is besloten om de muizen te tellen voor beide pilots en het maximaal aantal te gebruiken muizen om 1 diermodel uit te voeren. Dit is aangepast.

-D2: De tekst graag toespitsen op de experimenten in deze DAP. Beenmergtransplantatie is hier niet aan de orde.

Antwoord: De tekst is goed doorgespit om tekstuele fouten die niet in deze DAP horen eruit te halen. Er is één zin gevonden over beenmergtransplantatie en deze is verwijderd.

Niet-technische samenvatting:

-3.1: Deze tekst bevat (te) veel detail en technische termen voor de doelgroep.

Antwoord: De tekst is aangepast, een aantal details en technische termen zijn verwijderd.

-U wordt verzocht na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: Aanpassingen uit PP en DAPs die betrekken hebben op de NTS zijn aangepast: totaal aantal dieren van 1444 naar 1390.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. Er waren echter nog een aantal onduidelijkheden. Er zijn nog vragen gesteld.

Correspondentie met de aanvrager:

- Datum vragen: 01-04-2021

- Datum antwoorden: 09-04-2021

- Gestelde vragen en antwoorden:

- Klopt het dat de voorkeur eigenlijk uitgaat naar het LPS-model omdat nierfalen bij sepsis veel voorkomt en anti-GBM geïnduceerd nierfalen zeldzaam is (in DAP1 wordt gestart met het LPS-model, pas wanneer de resultaten niet goed te interpreteren zijn wordt het anti-GBM-model gebruikt)? Daarbij komt dat voor het LPS model de helft van het aantal dieren

nodig is, maar dat wordt niet als argument genoemd (terwijl dit wel een belangrijk argument zou zijn).

Antwoord: Het klopt inderdaad dat onze voorkeur uitgaat naar het LPS-model, om meerdere redenen. Zoals genoemd in de inleiding van de PP waar de voor- en tegenargumenten voor beide modellen worden besproken zijn er inderdaad dubbel zo veel dieren nodig voor het anti-GBM-model dan voor het LPS- model. Tevens hebben we het argument dat er minder dieren nodig zijn voor het LPS model in vergelijking met het anti-GBM model benoemd in de DAP onder het kopje vermindering:

“We zullen met het LPS model beginnen doordat het LPS model vaker voorkomt in patiënten terwijl het anti-GBM model uiterst zeldzaam is in patiënten en daarmee het LPS model dus relevanter voor de humane situatie. Tevens zijn voor het anti-GBM model meer dieren nodig doordat er twee tijdpunten moeten worden meegenomen en door het gebruik van anti-GBM konijn IgG waarvoor voor een gemiddelde batch 200 muizen en 20 konijnen benodigd zijn die behalve verschillende injecties ook perfusie moeten ondergaan en daardoor ongerief ondervinden (er is momenteel nog een kleine (maar voldoende) hoeveelheid anti-GBM konijn IgG beschikbaar, echter willen we hier door voorgenoemde redenen zuinig mee zijn).”

- Een ander voordeel van het LPS model zou kunnen zijn dat de mate van sepsis doseerbaar is (in het project is sprake van milde sepsis). Dit heeft wel gevolgen voor de DAP, er moet dan een LPS- dosis afhankelijkheid getest worden dan wel keuze voor een dosis uitgelegd worden.

Antwoord: Het is correct dat er milde sepsis zal worden geïnduceerd. Echter, we hebben in ons lab al veel ervaring met het induceren van LPS geïnduceerde nierfilterontsteking (benoemd als milde sepsis), ook met deze muizen waardoor we al weten welke dosis we moeten injecteren. Dit is nogmaals benadrukt door de volgende tekst toe te voegen aan de DAP bij animal procedures: Zowel met het LPS als voor het anti-GBM model hebben wij al ervaring met de specifieke muis die gebruikt zal worden, waardoor wij de dosis van LPS en anti-GBM die gebruikt moet worden weten.

- In de aan de introductie toegevoegde tekst wordt vermeld dat influx van immuuncellen, proteïnurie en verslechterde nierfunctie belangrijke symptomen zijn van nierfilterontsteking bij mensen. Hier verwijst u naar bij de beantwoording van de vraag naar de externe validiteit van de gekozen diermodellen. Het is onduidelijk in hoeverre er in de beide diermodellen ook in vergelijkbare mate sprake is van verslechterde nierfunctie: hoe wordt dit gemeten? De tekst over de externe validiteit van beide modellen is zonder verdere onderbouwing/uitleg niet goed navolgbaar.

Antwoord: Zowel het LPS model als het anti-GBM model zijn in de literatuur geaccepteerde modellen voor het induceren van nierfilterontsteking. Nierfilterontsteking leidt hierin tot verslechterde nierfunctie welke kan worden gemeten door de creatinine waardes te meten in het bloed, en in de urine van de muizen door het meten van albumine en creatinine (hiervoor zullen de muizen in metabole kooien worden gehuisvest de laatste dag van het experiment). Aan de tekst over de externe validiteit in de PP is een stuk toegevoegd:

Beide modellen gaan gepaard met de belangrijkste karakteristieke van nierfilterontsteking in de humane situatie: 1. influx van immuuncellen (welke gemeten zullen worden door IF kleuringen en/of

ELISA) 2. Proteïnurie (welke gemeten zal worden door het bepalen van de albumine en creatinine waardes in de urine van de muizen) en 3. verslechterde nierfunctie die gemeten zal worden door creatinine te meten in het bloed.

- De legenda bij het graphical abstract is incompleet, waardoor de illustratie lastig te begrijpen is. Graag alle cijfers en afkortingen uitleggen in de legenda, inclusief de aard van de targetcel.

Antwoord: De legenda is aangepast:

- Wat betreft de *ex-vivo* sensitisatie-experimenten: het gegeven antwoord lijkt te impliceren dat peritoneale macrofagen superieur zijn. Waarom worden dan ook gedifferentieerde beenmergcellen onderzocht? Hier zijn extra dieren voor nodig, maar nut en noodzaak van de experimenten met gedifferentieerde beenmergcellen zijn nu niet duidelijk beschreven. Ook is gevraagd of een keuze gemaakt zou kunnen worden op grond van een pilotexperiment, maar die vraag lijkt niet beantwoord. Als uit zo'n pilot blijkt dat er geen HPSE1-gemedieerde sensitisatie optreedt bij uit beenmerg gedifferentieerde macrofagen, dan zou dit onderzoek alleen met peritoneale macrofagen uitgevoerd hoeven worden (go / no go beslissing op basis van een pilot). Graag alsnog beantwoorden.

Antwoord: Op basis van de literatuur blijkt dat peritoneale macrofagen een sterkere response geven op stimuli dan beenmerg gedifferentieerde macrofagen. Echter, zoals beschreven in de vorige reactie en toegevoegd aan de PP is het zo dat cellen die verkregen worden/gedifferentieerd worden uit beenmerg meer divers zijn:

Uit beenmergcellen zullen ex vivo neutrofielen worden geïsoleerd en de beenmergcellen kunnen worden gedifferentieerd naar verschillende type macrofagen en dendritische cellen. Vervolgens zullen al deze cellen worden gesensitiseerd met recombinant HPSE1 en daaropvolgend een andere stimuli zoals TNF α of LPS ontvangen. Aangezien beschreven is dat uit beenmergcellen gedifferentieerde macrofagen minder gevoelig kunnen zijn voor stimuli in vergelijking met mature macrofagen in perifere weefsels en het fenotype van de verschillende macrofagen ook anders is (19), willen we ook peritoneale macrofagen testen. Het zijn dus additionele experimenten aangezien er zoals hierboven beschreven gekeken kan worden naar andere celtypes. Echter, hebben de voorgestelde go/no go op basis van een pilot toegevoegd aangezien we inderdaad niet alle muizen gaan injecteren of het beenmerg isoleren als uit de pilot ex vivo experimenten blijkt dat sensitisatie uitblijft. Dit is toegevoegd in de PP:

- Zijn CTSL^{-/-} muizen die een beginnende ontsteking hebben nog wel bruikbaar voor de *ex-vivo* experimenten? De immuuncellen van deze dieren zijn immers mogelijk al geactiveerd door de ontsteking, waardoor dit de uitkomst van de experimenten kan beïnvloeden. Graag heroverwegen of dieren met beginnende ontstekingen al uit de proef gehaald zouden moeten worden (extra wetenschappelijk eindpunt omdat het doel van de proef niet meer behaald kan worden).

Antwoord: Er is gekozen om de muizen met beginnende ontstekingen inderdaad uit de proef te halen. Dit eindpunt is toegevoegd in de DAP.

- Uw antwoord over de beschikbaarheid van voldoende anti-GBM-antistoffen is niet

compleet. Wat gaat u doen als blijkt dat het LPS-model niet volstaat om tot een conclusie te kunnen komen met betrekking tot de onderzoeksvraag en uw huidige hoeveelheid anti-GBM-antistoffen niet volstaat voor afronding van het onderzoek? U dient aan te geven hoeveel antistof beschikbaar moet zijn om een statistisch verantwoord experiment uit te kunnen voeren. De haalbaarheid van het project is nu niet goed in te schatten door de commissie.

Antwoord: Voor het indienen van de onderzoek aanvraag is de hoeveelheid anti-GBM die maximaal benodigd is uitgerekend en gecontroleerd of er nog voldoende aanwezig is. Dit is het geval. Dus de hoeveelheid die nu aanwezig is, is niet limiterend voor het project.

- In andere projectaanvragen wordt de procedure voor het opwekken van macrofagen in de buikholte met thioglycolaat als matig ongerief ingeschat. Wijkt uw protocol af van doorgaans gebruikte protocollen, waardoor u het ongerief voor de dieren inschat als licht in plaats van matig? Eventueel in overleg met de IvD de ongeriefinschatting aanpassen of onderbouwen waarom het als licht ongerief is ingeschat.

Antwoord: Bedankt voor het wijzen hierop. Wij waren hiervan niet op de hoogte en aangezien wij dit gewoon volgens standaard protocol doen, is in overleg met de IvD besloten om inderdaad deze ongeriefinschatting te veranderen van licht naar matig. Dit is ook aangepast in de classificatie van het ongerief van de experiment A, B en C in de DAP.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag richt zich op de rol van heparanase 1 (HPSE1) bij het ontstaan van schade aan het nierfilter door nierfilterontsteking bij diermodellen voor nierfilterontsteking, en de rol van nier- en immuuncellen (en de wisselwerking tussen deze cellen) hierbij. Het onderzoek is onderverdeeld in vier deelexperimenten waarin respectievelijk de rol van HPSE1 expressie in niercellen en/of immuuncellen, de rol van CTSL expressie, de rol van TLR2/4 in niercellen en/of immuuncellen, en het effect van systemische of celspecifieke HPSE1 remming op het ontstaan van nierschade in diermodellen voor nierfilterontsteking wordt onderzocht. De deelexperimenten worden met verschillende knock-out muizenstammen uitgevoerd, waarbij gekeken wordt naar proteïnurie, nierfunctie, histologie van het nierweefsel, HPSE1 activiteit, ontstekingsmarkers (cytokines, mRNA expressie van eiwitten betrokken bij ontsteking, influx van immuuncellen), en overige activatiemarkers voor immuuncellen (cytokineproductie, HS-expressie op het celoppervlak). Parallel aan de *in vivo* experimenten zullen *ex vivo* experimenten met uit beenmergcellen gedifferentieerde en met mature macrofagen worden uitgevoerd, waarin het mechanisme dat leidt tot de sensitatie van immuuncellen zal worden onderzocht. Wanneer met het LPS-model genoeg en eenduidige informatie kan worden verkregen met betrekking tot de onderzoeksvraag, dan zal het anti-GBM-model niet gebruikt worden. Eén van de deelexperimenten kan echter alleen uitgevoerd worden met het anti-GBM-model. De commissie

constateert op grond daarvan dat deze aanvraag een concrete, goed afgebakende doelstelling heeft en getypeerd kan worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de 'Handreiking invulling definitie project'. De verschillende deelexperimenten/subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid en zij tezamen een geïntegreerd begrip van de rol van HPSE1 en van nier- en immuuncellen en de wisselwerking daartussen geven bij het ontstaan van schade aan het nierfilter door nierfilterontsteking. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De experimenten zullen zowel mechanistisch inzicht opleveren in de processen die een rol spelen bij het ontstaan van schade aan het nierfilter bij nierfilterontsteking (basaal wetenschappelijk onderzoek), als inzichten die kunnen leiden tot de ontwikkeling van interventies die (verergering van) schade aan het nierfilter van mensen met een nierfilterontsteking kunnen tegengaan (toegepast onderzoek).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het bestuderen van de dynamische wisselwerking tussen nieren en immuuncellen en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde sensitivatie van nier- en immuuncellen in diermodellen voor nierfilterontsteking. Op basis van de verkregen resultaten zullen twee nieuwe therapieën voor mogelijke remming van HPSE1 worden uitgetest om schade aan het nierfilter te verminderen en/of te voorkomen. Het uiteindelijke doel is bij te dragen aan de ontwikkeling van een effectieve therapie voor mensen met nierfilterontsteking (de ontsteking leidt tot proteïnurie) zodat nierschade voorkomen of verminderd kan worden. De onderzoekers maken gebruik van twee diermodellen voor nierfilterontsteking: het LPS-model en het anti-GBM model, die beide belangrijke voordelen hebben maar ook nadelen. De onderzoekers zijn van mening dat het LPS-model meer lijkt op de situatie in de kliniek waar sepsis geïnduceerd nierfalen vaak voorkomt bij mensen op de IC. Het LPS-model is relatief kortdurend en in tegenstelling tot het anti-GBM model kan volstaan worden met een analyse 48 uur na inductie van de schade, terwijl in het anti-GBM model op twee tijdstippen analyse plaatsvindt waardoor twee keer zoveel dieren nodig zijn. Indien mogelijk maken zij daarom zoveel mogelijk gebruik van het LPS-model. Echter bij het onderzoek naar de rol van de TLR2/4 kan het LPS-model niet gebruikt worden omdat TLR2/4 de receptor is voor LPS. Het LPS-model geeft geen ontsteking in nieren van TLR2/4 deficiënte dieren, waardoor gebruik van het GBM-model dan meer voor de hand ligt. Het is aannemelijk dat in mensen en muizen dezelfde processen en mechanismen een rol spelen bij nierfilterontsteking en het ontstaan van nierschade, waardoor het ook aannemelijk is dat therapieën die ontwikkeld worden op basis van de resultaten van dit onderzoek werkzaam zullen kunnen zijn bij mensen. Dergelijke therapieën dienen wel eerst uitgetest te worden in klinisch onderzoek voordat ze op grote schaal toegepast kunnen worden bij mensen met chronische nierziekten/proteïnurie. Er is daarom binnen deze aanvraag wel een reële maar geen

directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van cellen en processen die een rol spelen bij HPSE1 gemedieerde sensitisatie in nierfilterontsteking nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor mensen met nierfilterontsteking cq. proteïnurie, en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingen om progressie tot nierfalen en afhankelijkheid van niervervangende therapieën (dialyse, niertransplantatie) te voorkomen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers, de wetenschappelijke gemeenschap en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast (zie C11 en C12). De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Voor de wetenschappelijke gemeenschap is dit onderzoek van belang, onder meer omdat het basale kennis zal opleveren over effecten van het sensibiliseren van immuuncellen en niercellen. Andere onderzoekers die zich richten op immuuncellen of niercellen kunnen deze kennis gebruiken in hun eigen onderzoek, waardoor uiteindelijk de kennis over de functie van deze cellen zal toenemen. De commissie acht het vergroten van wetenschappelijke kennis van substantieel belang.
Voor patiënten is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van betere diagnostiek en/of nieuwe behandelingen voor chronische nierziekten/proteïnurie. Gerichtte behandeling op basis van mechanistisch inzicht in cellen en processen die een rol spelen bij het ontstaan van onomkeerbare schade aan het nierfilter kan bijdragen aan accuratere diagnostiek en een effectievere behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt minder snel afhankelijk wordt van niervervangende therapieën. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor chronische nierziekten, is van groot belang voor de samenleving.
6. De aanvrager maakt geen melding van onbedoelde nadelige effecten op het milieu. Er is geen aanleiding voor de DEC om te verwachten dat die er zullen zijn.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager heeft zeer veel ervaring met onderzoek op het gebied van nierfalen. Ook heeft de onderzoeker veel ervaring met de muismodellen die in dit project zullen worden gebruikt. Het onderzoek heeft geresulteerd in tal van publicaties in goede wetenschappelijke tijdschriften. De commissie is daarom overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde, onder andere op grond van een artikel 9 kwalificatie, om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.

8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan (zie C1 en C4). Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De commissie heeft de aanvrager verzocht de keuze voor de te gebruiken diermodellen beter te onderbouwen, aangezien beide modellen matig ongerief voor de dieren veroorzaken en het bovendien nodig is om bij 10% van de dieren een humaan eindpunt toe te passen. Ook was niet duidelijk in hoeverre de systemische ontstekingen in het LPS-model verstorend zouden kunnen werken op de resultaten. De antwoorden van de aanvrager hebben de commissie overtuigd van de validiteit van beide diermodellen. De onderzoekers hebben veel ervaring met beide modellen in de context van nieronderzoek.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. In de aanvraag wordt, om wetenschappelijke redenen afgeweken van de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU betreffende de huisvesting en verzorging van de dieren. Aan het einde van de proef zullen de dieren solitair gehuisvest worden in metabole kooien gedurende 18 uur. De aanvrager geeft daarvoor de volgende reden(en): Gedurende deze periode zal urine verzameld worden om de mate van proteïnurie te kunnen bepalen, een belangrijke uitlees parameter van de experimenten. De DEC is van mening dat de gegeven redenen voldoende onderbouwing hiervoor zijn en dat deze bepaling niet op een andere wijze kan worden uitgevoerd.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het induceren van nierschade met LPS of met anti-GBM. Daarnaast wordt ongerief veroorzaakt door bloedafnames, beenmerg transplantatie, de solitaire huisvesting in metabole kooien, het induceren van macrofagen in de buikholte met thioglycolaat, en ontstaat ongerief ten gevolge van het ontbreken van CTSL. Het merendeel van de dieren zal daardoor matig ongerief ondergaan (1032 van de maximaal 1430 dieren). De overige dieren zullen licht ongerief ervaren. De commissie merkt hierbij wel op dat zij zich heeft gebaseerd op de aantallen die in de NTS worden gegeven, omdat het lastig is om deze aantallen na te volgen aan de hand van de informatie in de bijlagen.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven. De dieren die door een genetisch defect het gen CTSL missen zullen een aangetast fenotype hebben dat kan resulteren in huidaandoeningen en mogelijk blindheid. Door de dieren in de experimenten te gebruiken voordat deze afwijkingen

manifest worden zal dit zoveel mogelijk worden voorkomen, maar kan niet worden uitgesloten dat 20% van deze dieren een licht aangetast fenotype zullen hebben waardoor zij gehinderd worden in hun normale gedrag en de zelfredzaamheid afneemt. De commissie is echter van oordeel dat bij de experimenten met deze dieren het ongerief veroorzaakt door het induceren van nierfalen in de ethische afweging op de voorgrond dient te staan. Voor het overige is er geen sprake van een aantasting van de integriteit.

13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met de gebruikte nierschade modellen ingeschat en zal maximaal 10% zijn. Voor de dieren die geen CTSL gen hebben is de inschatting dat 20% van deze dieren het humane eindpunt zal bereiken. In alle gevallen zal zorg worden gedragen dat de dieren nooit meer dan matig ongerief zullen ervaren. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Om de mechanismen van HPSE1 gemedieerde sensitisatie van niercellen en immuuncellen en hun bijdragen aan het ontstaan van nierschade te kunnen bestuderen is het nodig dit in een intact organisme te onderzoeken. Waar mogelijk zullen experimenten *in vitro* worden uitgevoerd.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door bij voorkeur te gaan werken met het LPS-model zullen zo min mogelijk dieren worden gebruikt. Het anti-GBM model heeft twee maal zoveel dieren nodig om tot dezelfde resultaten te komen. Daarnaast zullen voor elk experiment power berekeningen worden uitgevoerd om te bepalen met welk minimum aantal dieren nog goede resultaten kunnen worden verkregen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De dieren zullen wanneer ze in metabole kooien worden gehuisvest in een ruimte met een verhoogde temperatuur geplaatst worden, omdat gedurende die periode bedding ontbreekt. De dieren die het CTSL gen missen zullen tijdig uit de proef genomen worden voordat er door dit defect matig ongerief optreedt. Ook zullen deze dieren aangepast voer krijgen en het op de bodem van de kooi aangeboden krijgen om te zorgen dat ze voldoende voedsel tot zich kunnen nemen. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: Mannelijke en vrouwelijke dieren verschillen in hun reactie op ontstekingsprocessen. De variatie die hierdoor ontstaat zal er toe leiden dat er een substantiële hoeveelheid extra dieren nodig is voor het verkrijgen van betrouwbare resultaten.

Gezien het feit dat er in dit project gebruik gemaakt wordt van belastende diermodellen, meent de DEC dat het beperken van het aantal dieren in experiment vanuit ethisch gezichtspunt prioriteit verdient boven het beperken van het fokoverschot van vrouwelijke dieren. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren. De aanvrager heeft aangegeven dat mogelijk de proeven herhaald zullen worden met vrouwelijke dieren. De DEC is er van uit gegaan dat deze herhaling met vrouwelijke dieren geen onderdeel is van het huidige project.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen)

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van het bestuderen van de rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde sensitisatie van nier- en immuuncellen in diermodellen voor nierfilterontsteking, alsook het testen van interventie strategieën om HPSE1 te remmen, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een maximaal matige aantasting van het welzijn en een aantasting van de integriteit van de proefdieren plaats. De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken (beschreven in C9 tot C20).
Voor de wetenschap is het onderzoek van belang omdat het meer kennis zal opleveren over de rol van HPSE1 bij het ontstaan van nierfalen (onder meer door kennis van het effect van sensitisatie van nier- en immuuncellen). Voor patiënten is dit onderzoek op de lange termijn van belang, omdat het uiteindelijk kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Nierfalen komt bij 10% van de bevolking wereldwijd voor. Deze patiënten zijn afhankelijk van niervervangende therapie zoals dialyse en niertransplantatie. Nierfalen heeft een grote impact op de patiënten en hun directe omgeving. Veel patiënten hebben nauwelijks baat bij de huidige therapieën. De resultaten van dit project zullen op den duur kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuwe therapie voor deze mensen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor nierfalen van substantieel belang.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het bestuderen van de rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde

sensitisatie van nier- en immuuncellen in diermodellen voor nierfilterontsteking als ook het testen van interventie strategieën om HPSE1 te remmen. Het uiteindelijke doel daarvan is nieuwe therapieën te ontwikkelen voor nierfalen bij de mens. Nierfalen is een ernstige aandoening die wereldwijd voorkomt bij 10% van de bevolking. De huidige behandeling is niervervangende therapie zoals dialyse en niertransplantatie. Dat zijn ingrijpende behandelingen voor terminaal nierfalen. Als dat voorkomen kan worden met effectieve therapie voordat terminaal nierfalen optreedt is daarvan veel winst voor patiënten en maatschappij te behalen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Datum:

14 juni 2021

Aanvraagnummer:

AVD10300202114613

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

14 juni 2021

Aanvraagnummer:

AVD10300202114613

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 juni 2021 tot en met 30 april 2025, voor het project "Heparanase: a double-edged sword in the development of glomerulonephritis " met aanvraagnummer AVD10300202114613, na advies van dierexperimentencommissie RU DEC . De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD student. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 4 maart 2021
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Deelexperiment A, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
 - 3.4.4.2 Deelexperiment B, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
 - 3.4.4.3 Deelexperiment C, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
 - 3.4.4.4 Deelexperiment D, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 26 april 2021
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 4 juni 2021, 9 juni 2021.

Aanvraagnummer: AVD10300202114613

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Deelexperiment A			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / C57Bl/6J HPSE1 wildtype of knockout (-/-), 8-18 weken	486	75,0% Matig 25,0% Licht
3.4.4.2 Deelexperiment B			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / C57Bl/6J, CTSL knockout (-/-)	145	76,0% Matig 24,0% Licht
3.4.4.3 Deelexperiment C			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / C57Bl/6J wildtype of TLR2/4 dubbel knockout (-/-), 8-18 weken	348	73,0% Matig 27,0% Licht
3.4.4.4 Deelexperiment D			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / C57Bl/6J, 8-12 weken	424	93,0% Matig 7,0% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:
AVD10300202114613

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:
AVD10300202114613

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.



Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10.2 e. en g
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 10.2 e. en g
- 1.3 Provide the title of the project. Creating a low-risk strategy for rapid and efficient engraftment after hematopoietic stem cell transplantation

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has proven to be effective for the treatment of hematopoietic disorders. Combining HSCT with upcoming clinically safe genome editing tools will revolutionize the therapeutic approach to treat inherited blood diseases such as sickle cell anaemia and

primary immune-deficiencies including X-linked severe combined immunodeficiency (SCID). However, current preparation for HSCT carries significant toxicity due to the temporary loss of hematopoiesis as a result of radiation or chemotherapy that put the patient at high risk of life-threatening infections and toxicity. Severe infections frequently present in the immediate post-HSCT period, while complications caused by chemo-toxicity and irradiation damage affect multiple organs in the long term. For example, HSCT patients have a four to nine-fold increased risk of early death and a 30% lower life expectancy. HSCT recipients are at a 2.3- to 4.0-fold increased risk of death due to cardiac disease when compared with the general population. In addition, HSCT recipients demonstrated compromised pulmonary function in 45% of the patients. Also, the majority of female survivors under the age of 40 years have infertility concerns. The cumulative probability of poor prognostic treatment-related (t) MDS/t-AML ranges from 1.1% at 20 months to 24.3% at 43 months after autologous HSCT. Some children with for instance Fanconi anemia, a group of patients with severe DNA repair deficiency, cannot be treated with HSCT due to the high toxicity of BM conditioning. Therefore, the high mortality and morbidity rates, although acceptable for malignant diseases, make the risk benefit ratio too high to apply HSCT for most non-life-threatening disorders.

Antibody-mediated depletion of hematopoietic stem cells may be a solution to reduce the toxicity of bone marrow conditioning prior to HSCT. Although recent studies show proof of concept, the first results of an ongoing clinical trial [10.1 c en 10.2 g](#)

[10.1 c en 10.2 g](#) In this study the full length antibody against c-KIT was used, and HSCT was only performed when antibody plasma levels post-injection reached <100ng/mL. This level of antibody clearance took up to 20 days post-treatment. Due to the long time-period between the injection of antibodies and reaching the level suitable for HSCT, the simultaneous recovery of the endogenous hematopoietic stem cell pool is a potential problem of this strategy as these compete with the transplanted hematopoietic stem cells. The degree of partial space for hematopoietic stem cells created in the BM is also unknown and the kinetics of this space may be difficult to determine. In summary, targeted depletion of hematopoietic stem cells show promise for the treatment of genetic and immune disorders, but needs optimization to reduce the risks, as was recently highlighted in the December 2019 issue of Nature, [10.2 e. eng](#). (See also schematic overview Figure 1). The low-risk solution that we propose in this project is the engineering and pre-clinically testing of antibodies that rapidly and transiently deplete human hematopoietic stem cells to create the desired bone marrow (BM) space that allows for sufficient human hematopoietic stem cells engraftment. Highly effective HSC depleting antibodies that have a short half-life in the body would be ideal for rapid and efficient treatment of patients and strongly improve the protocol. Our research team will generate novel antibodies in close collaboration with a biochemical company that is specialized in antibody development and production. Our research team is highly-specialized in the development of antibodies for increasing the selective cell killing activity, influencing stability of antibodies by e.g. mutations in Fc region and development of short antibodies with improved functions. Such antibodies would facilitate BM conditioning without the risk of infections and toxicity and result in higher level of stem cell chimerism

(>10% chimerism improvement, see also schematic overview Figure 1).

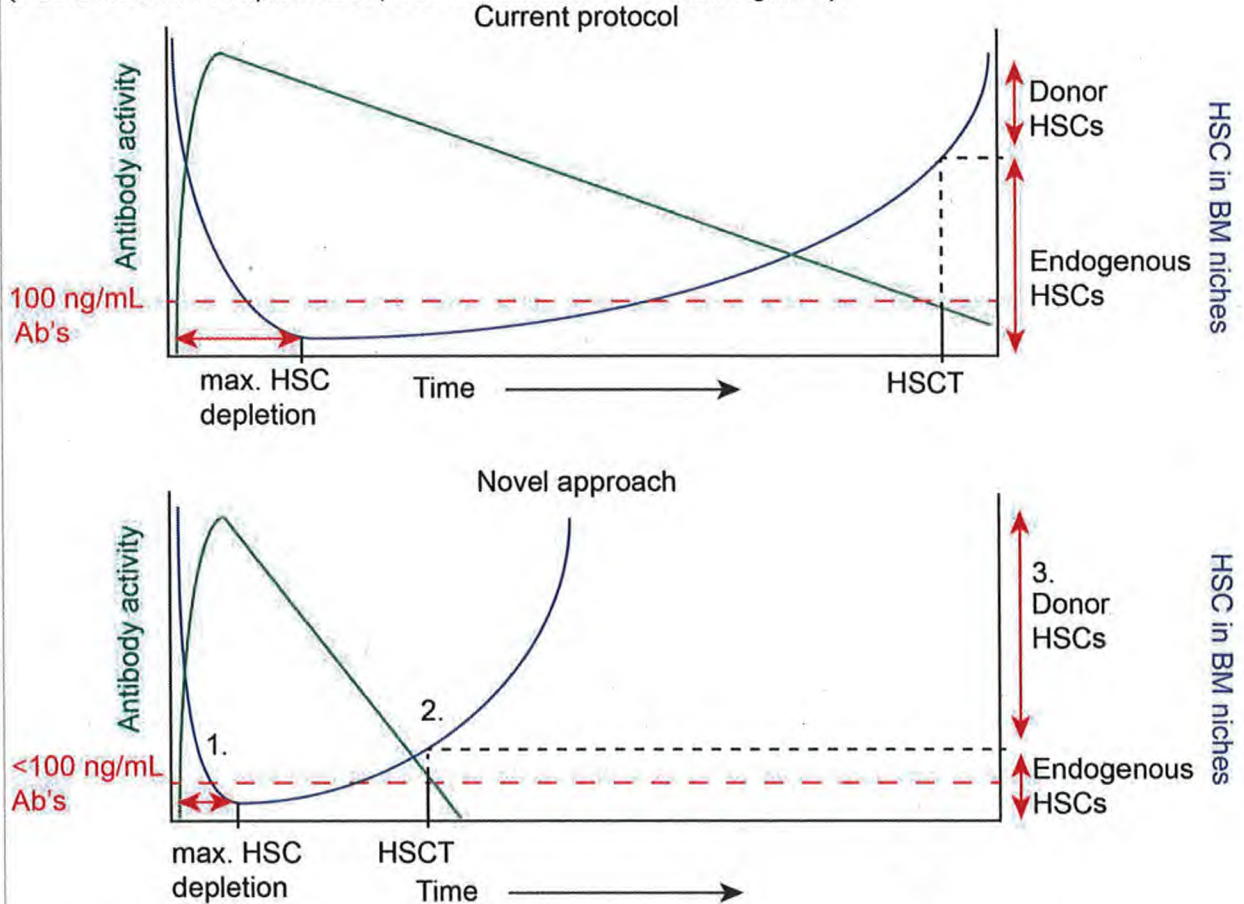


Figure 1: Schematic overview of the kinetics of current c-KIT antibody-mediated depletion of human hematopoietic stem cells (HSCs) and our novel approach.

We expect to improve the current HSCT protocol in three ways: **10.1 c en 10.2 g**

[Redacted text]

With a reduced half-life (T1/2) (<50%) and an improved activity of the antibody (>2Fold) we expect to improve the chimerism after transplantation with at least 10 percent points. Green: Antibody activity, Blue: host HSC in BM niches, Red: concentration limit Ab's for HSC transplantation

Using such antibodies, HSC depletion could be achieved by targeting the c-KIT/CD117 receptor, which is a characteristic molecule on all HSCs. By determining the optimal engineering of antibodies needed for HSC depletion, we will gain important knowledge about how these antibodies function in vivo in mice and generate new ones. Low risk HSC depletion would fulfil a great unmet need for a safe HSCT approach. Importantly, this optimized approach will be useful for autologous transplantation with genetically-corrected HSCs. Such a personalized medicine approach would benefit large numbers of patients with inherited disorders affecting haematopoiesis and the immune system without the risk of life-threatening infections and organ damage.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

Currently, the minimal healthy donor chimerism in the BM after transplantation for life-long treatment of children is not known. However, a substantial reduced overall stem cell number is expected with age. Therefore, a patient with a low percentage chimerism is at high risk to lose the healthy hematopoietic stem cells in time. In addition, it is well-known that not all hematopoietic stem cells are active in the BM. Patients with a low chimerism are at high risk for a relapse, which is life-threatening condition. To reduce this risk, our main goal is to reach >20% chimerism. We hypothesize (Figure 1) that antibodies with a reduced T1/2 of 50% and a >2 hematopoietic stem cell depletion capacity will be sufficient to reach our main goal. The choice of our criteria is arbitrary and to reach substantial effects (still no fine-tuning).

The main objective is to improve the kinetics and magnitude of c-KIT antibody-mediated conditioning prior to HSCT to enhance donor HSC chimerism in the BM after transplantation. Our team, including scientists and a biochemical company that are specialized in antibody development and production, will develop and generate novel antibodies to target hematopoietic stem and progenitor cells. We will select novel C-KIT antibodies that are tested in vitro for their binding capacity to human hematopoietic stem cells. The next step is to test these candidate antibodies for their pharmacokinetics, stem cell depletion capacity and improved stem cell replacement in vivo in mice. We will address the following research questions:

1. What is the **pharmacokinetics (PK)** of the novel antibodies?
2. Which antibodies have an increased **HSC depletion capacity**?
3. Do the novel antibodies improve the conditioning of the mice prior to **HSC transplantation**?

This objective is achievable, because our department has the right expertise for this area of research. Furthermore, we will make use of standardised mouse models from [10.2.e.eng](#) and an established experimental setup to test the capacity of our novel antibodies. Therefore, we expect to be able to test the capacity of our novel c-KIT antibodies in mice which will give invaluable insights for the selection of an improved antibody for clinical studies.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Scientific relevance: We expect to develop novel antibodies that are highly active in vivo and enable for non-toxic and rapid depletion of human hematopoietic stem cells. We will gain important knowledge about how these antibodies function in vivo in mice and how we can improve the antibodies for a combination of low PK and high antibody killing activity. Our experiments will give important new insights in how we can influence the kinetics of antibody-mediated hematopoietic stem cell depletion and HSCT in vivo. We will publish our results in peer reviewed journals.

Social relevance: We expect that the novel c-KIT antibodies will strongly improve transplantation results of a large number of patients in need for HSCT without severe toxicity of the bone marrow conditioning. This novel approach is needed to make the upcoming genome editing tools that are currently in development for the generation of genetically corrected autologous HSCs successful. The improved HSCT protocol will enhance the quality of life of a large group of patients in need for HSCT due to improved donor stem cell engraftment efficiencies leading to more stable donor haematopoiesis and lack of toxicity post-HSCT. We are confident that our new antibody approach will help patients with severe inherited hematopoietic diseases such as red blood cell defects and primary immune-deficiencies, which suffer from severe chronic illness and lifelong disabilities, to be able to fully participate in society. However, also other patients in need for HSCT, such as anaemia and leukaemia patients, will benefit from the novel antibodies for improved bone marrow conditioning without toxicity.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

We will generate novel antibodies against c-KIT to improve bone marrow conditioning prior to HSCT. To test novel antibodies in vivo we have a strategy designed (See Figure 2 Go-No-Go for overview) that answers our three research questions:

Creating a low-risk strategy for rapid and efficient engraftment after HSC transplantation

Go-No-Go

Procedure 1: Determination of PK values

Mouse strain: 10.1 c en 10.2 g



Reduced T1/2 (>50%)

Procedure 2: HSC depletion assay

Mouse strain: 10.1 c en 10.2 g



Enhanced HSC depletion (>2 Fold)

Procedure 3: HSC transplantation

Mouse strain: 10.1 c en 10.2 g



Improved HSC transplantation
Future clinical studies (>10%)

Figure 2: Go-No-Go overview. Experimental procedures 1-3, the number of antibodies that will be tested and the number of mice per experiment are shown.

Novel antibodies will first be selected based on their binding capacity to human hematopoietic stem cells in vitro. Only antibodies that bind to human hematopoietic stem cells will be tested for their pharmacokinetics and killing capacity. These tests can only be performed in vivo. The elimination kinetics is driven by degradation of the antibodies rather than excretion and many cell types, organs and proteins are involved in this complex process. Furthermore, the in vivo cytotoxic properties of the antibodies, in terms of stem cell niches in the bone marrow which are complex structures with various essential cell types and growth factors, are poorly predicted by in vitro findings.

Research question 1: What is the pharmacokinetics (PK) of the novel antibodies?

Strategy: We will develop novel c-KIT antibodies with shorter half-life and an improved hematopoietic stem cell depletion capacity. We will test a maximum of 20 antibodies and one control antibody. Mice will be intraperitoneally (IP) injected with novel anti-c-KIT antibodies or a control antibody. Plasma antibody levels will be monitored in time. 10.1 c en 10.2 g

Research question 2: Which antibodies have an increased HSC depletion capacity?

Strategy: Antibodies with a reduced half-life compared to the control anti-c-KIT antibody will now be tested for their capacity to eliminate human hematopoietic stem cells in mice. We will test a maximum of 5 antibodies and 1 control antibody. Humanized mice, containing human hematopoietic stem cells, will be injected IP with the selected c-KIT antibodies or with an unmodified control antibody. 10.1 c en 10.2 g

hematopoietic stem cells will be determined. Three antibodies with an enhanced hematopoietic stem cell depletion capacity (>2Fold) will be selected for answering research question 3.

Research question 3. Do the novel antibodies improve the conditioning of the mice prior to HSC transplantation?

Strategy: To address this question, we will treat mice, having human hematopoietic stem cells, with selected antibodies and perform reconstitution experiments. We will test a maximum of three antibodies and one control antibody. The chimerism in the human hematopoietic stem cells will be detected and compared to control mice that are only treated with unmodified control c-KIT antibodies for comparison. Antibodies with a conditioning capacity that results in a higher level of hematopoietic stem cell chimerism (>10% chimerism improvement) is considered as successful and will be selected for further clinical studies.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

- 1. PK determination 1 (105 humanized mice):** In order to answer research question 1, mice will be injected IP with antibodies (100 µL, PBS). Mice will receive the antibodies only once. Blood samples (20 µL) will be taken from the submandibular bleeding at different time points (Day 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21). The amount of antibodies in the blood will be determined by ELISA. The PK values will be calculated. Those antibodies with lower PK values (<50%) will be selected for research question 2. Research question 1 will make use of Appendix 1.
- 2. HSC depletion capacity (180 humanized mice containing human hematopoietic stem cells):** For answering research question 2, mice will be injected IP with antibodies (100 µL, PBS) selected in section 1. The mice will receive the antibodies only once. The experiment will last for 14 days maximum. blood cell analysis (Flow cytometry) and BM analysis (Flow cytometry) at six different time points (Day 1, 2, 3, 5, 7, 14). Those antibodies with more than 2 Fold increase in HSC depletion capacity will be selected to move forward to research question 3. Research question 2 will make use of Appendix 2.
- 3. HSC transplantation (168 humanized mice containing human hematopoietic stem cells):** Mice will be injected IP with antibodies (100µL, PBS) once. Typically, an experiment will last 140 days maximum. Blood samples will be taken submandibular bleeding at different time points (once a week, 100 µL) for antibody concentration (ELISA) and human blood cell analysis (Flow cytometry). Mice will be transplanted with human hematopoietic stem cells in 100 µL PBS) with tail vein injection at the optimal time-point as determined in section 2 (research question 2). Mice will be monitored for antibody levels and chimerism in blood weekly and hematopoietic stem cell chimerism in the BM (human leukocyte antigen (HLA) labeling and Flow cytometry). Those antibodies with improved HSCT (> 10% stem cell chimerism improvement) will be considered successful. Research question 3 will make use of Appendix 3.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

The design of this project is straightforward and contains three stages. **The first stage** is to test novel antibodies for PK. The c-KIT antibodies with reduced half-life compared to control antibody (<50%) will be selected for the second stage. **The second stage** is to test novel antibodies with reduced half-life for their capacity to deplete HSCs. The c-KIT antibodies with an enhanced HSC depletion capacity (>2Fold) will be selected for the final test. **The last stage** is to test selected antibodies for improved HSCT with transplantation studies. These antibodies that result in higher level of human hematopoietic stem cell chimerism improvement (> 10%) will be selected for further translational studies.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Determination of PK values
2	Hematopoietic stem cell depletion assay
3	Hematopoietic stem cell transplantation
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD ^{10.2 en 10.2g} 202010607
 2. Titel van het project: Creating a low-risk strategy for rapid and efficient engraftment after hematopoietic stem cell transplantation
 3. Titel van de NTS: De ontwikkeling van een laag-risico strategie voor een snelle en efficiënte hematopoïëtische stamceltransplantatie.
 4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: 10.2 .e. en g
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.2 .e. en g
 - e-mailadres contactpersoon: 10.2 .e. en g
 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 31-07-2020 (07-08-2020: Verzoek om advies van CCD)
 - aanvraag compleet: 18-08-2020
 - in vergadering besproken: 07-08-2020
 - anderszins behandeld: telefonische terugkoppeling op 03-09-2020
 - termijnonderbreking(en): van 09-08-2020 tot 18-08-2020 en van 20-08-2020 tot 03-09-2020
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 18-08-2020 en 03-09-2020
 - advies aan CCD: Het advies is 13-09-2020 verstuurd naar de CCD
 7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD van de instelling.
- Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.*
8. Eventueel horen van aanvrager : NVT
 9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 09-08-2020 en 20-08-2020 (omdat enkele vragen uit de eerste vragenronde nog onvoldoende beantwoord waren)
 - De gestelde vragen betroffen:
 - De stand van wetenschap en praktijk van stamcel transplantatie
 - Expertise van onderzoeker inzake antilichaam productie
 - Entree criteria voor antilichamen voordat deze in vivo getest zullen worden
 - Wetenschappelijk belang van het onderzoek

- Onderbouwing keuzes bij go / no go momenten. Met name de keuze keuzes met betrekking tot de 50% reductie in T1/2 en de >2 verhoogde HSC depletie werd verzocht toe te lichten.
 - Onderbouwing van het aantal tijdstippen waarop dieren worden gedood om het cel-chimaerisme te analyseren.
 - Onderbouwing ongerief, uitval en humane eindpunten.
 - Onderbouwing aantallen dieren
- Datum antwoord: 18-08-2020 en 03-09-2020
- Datum: 20-08-2020 en 08-09-2020 (omdat enkele vragen uit de eerste vragenronde nog onvoldoende beantwoord waren en/of de antwoorden niet in de aanvraag waren verwerkt)
- Onderbouwing keuzes bij go / no go momenten. Met name de keuze keuzes met betrekking tot de 50% reductie in T1/2 en de >2 verhoogde HSC depletie werd verzocht toe te lichten.
 - Onderbouwing ongerief, uitval en humane eindpunten.
 - Onderbouwing aantallen dieren
- Datum antwoord: 08-09-2020 en 11-09-2020

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): NVT

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Geen van de aanwezige DEC-leden is betrokken bij het project of de aanvrager.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld.*)

Transplantatie van (autologe, genetisch gemodificeerde) hematopoiëtische stamcellen is voor de behandeling van patiënten met een genetische afwijking in hun hematopoiëtische cellen een essentiële therapie. Om te kunnen transplanteren is er fysieke ruimte nodig in het hematopoiëtische systeem van de ontvanger zodat de getransplanteerde cellen in voldoende mate aanwezig zullen zijn na de transplantatie. Het maken van deze ruimte gaat nu gepaard met een rigoureuze voorbehandeling (bestraling, chemotherapie) die het risico op levensbedreigende infecties in de periode direct na de transplantatie en op termijn risico's van andere aandoeningen met zich meebrengt (hartfalen, maligniteiten). Een mogelijk betere methode is om specifiek de stamcellen van de ontvanger te verwijderen door de behandeling met een stamcel specifiek antilichaam waardoor de late effecten veroorzaakt door bestraling en/of chemotherapie kunnen worden vermeden. Het antilichaam dat op dit moment wordt gebruikt in klinische studies, heeft een lange halfwaardetijd, en er kan pas getransplanteerd worden op het moment dat de te transplanteren cellen niet meer kunnen worden verwijderd door de nog in de circulatie aanwezige antilichamen. Door die lange periode is er ook een kans dat de eigen, niet goed functionerende stamcellen weer op een relatief hoog niveau terug

zijn waardoor de ruimte voor het aandeel nieuwe stamcellen relatief laag is (chimaerisme van slechts 0 – 10%). Door verbeterde antilichamen te maken met een kortere halfwaardetijd die slechts kort circuleren en tevens snel een voldoende depletie van de stamcellen teweegbrengen, zou de transplantatie sneller na de depletie kunnen plaatsvinden met als resultaat dat het aandeel donor stamcellen hoger zal zijn. De verwachting is dat op deze wijze de getransplanteerde stamcellen blijvend in voldoende hoeveelheden in de ontvanger aanwezig zullen zijn.

Het onderzoek beoogt nieuwe antilichamen die deze verbeterde eigenschappen hebben te selecteren en deze te testen op de volgende eigenschappen: verbeterde farmacokinetiek en resulterend in voldoende chimaerisme (verhouding getransplanteerde stamcellen ten opzichte van aanwezige stamcellen).

Het onderzoek wordt gefaseerd uitgevoerd (zie C8). De indiener heeft aangegeven welke criteria (milestones, selectiecriteria, go/no go momenten) de start en volgorde van uitvoering van de verschillende dierexperimenten binnen het project bepalen.

Er is binnen de instelling veel ervaring met de betreffende modellen en gebruikte meetmethodes. Ook is veel ervaring met het ontwikkelen van antilichamen. De vertaling van de doelstellingen naar de experimenten is inzichtelijk en herleidbaar. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan.

De commissie is dan ook van mening dat de samenhang binnen het project voldoende is aangetoond en dat het project toetsbaar is.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet).

Voor zover de DEC kan nagaan is er geen tegenstrijdige wetgeving die uitvoering van het project in de weg zou kunnen staan.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelestellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De in de projectaanvraag aangekruiste doelcategoriën sluiten aan bij de doelstellingen van het project.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uiteindelijke doel van dit project is het beschikbaar maken voor de kliniek van stamcel depletierende antilichamen waarmee het resultaat van een stamceltransplantatie wordt verbeterd en de risico's voor de patiënt worden gereduceerd. Deze verbeterde behandeling houdt in dat er een voldoende en stabiel stamcel chimaerisme ontstaat zodat er weer voldoende (normale) bloedcellen worden geproduceerd en patiënten minder directe en late bijeffecten van de stamceldepletie zullen ondervinden.

Het project heeft drie directe doelstellingen.

1. Het testen van een verbeterde farmacokinetiek van nieuw ontwikkelde humane stamcel specifieke antilichamen
2. Het testen van het depletierend vermogen van deze antilichamen

3. Het onderzoeken van het (verbeterde) stamcel chimaerisme na transplantatie.

Het onderzoek zal in een speciale muizenstam worden uitgevoerd die door het fokbedrijf is ontwikkeld om dit type antilichamen te testen. Bij subdoel 2 en 3 zal gebruik gemaakt worden van muizen die door het fokbedrijf na een sub-lethale dosis straling humane stamcellen hebben ontvangen. Deze voorbehandeling is nodig omdat de experimenten erop gericht zijn uiteindelijk humane stamcellen te verwijderen.

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met dit type onderzoek en de daarbij gebruikte modellen.

Het is aannemelijk dat, mede door de inbedding, positieve resultaten uit dit onderzoek uiteindelijk zullen leiden tot toepassingen in de kliniek.

De DEC is van mening dat er binnen dit project een reële directe relatie is tussen de directe doelen en het uiteindelijke doel. Voorts is zij van mening dat de directe doelen in wetenschappelijke en klinische zin gerechtvaardigd zijn omdat het nieuwe antilichamen zal opleveren die van belang zijn voor verder wetenschappelijk en klinisch onderzoek in dit vakgebied. Het onderzoek sluit aan bij de huidige stand van zaken in dit onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden van het onderzoek beschreven in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de doelgroep/patiënten/maatschappij, de onderzoekers en de wetenschap.

De proefdieren worden door het instrumentele gebruik, de interventies (oa bestraling, stamceltransplantaties, bloedafnames), de huisvesting in een proefdierfaciliteit (beperking van natuurlijke gedrag) en in een aantal gevallen de genetische modificatie aangetast in hun integriteit. Uiteindelijk zullen alle dieren in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Bij alle dieren is er tijdens de experimenten bij de indiener een risico op licht ongerief door het injecteren van antistoffen, het ondergaan van de stamcel transplantaties en het regelmatig bloed afnemen. Ook is er een (klein) risico op ongerief veroorzaakt door het feit dat de dieren immuundeficiënt zijn (NOD muizen).

De dieren ondergaan bij de fokker een sub-lethale bestraling en een humane stamceltransplantatie.

Voor de patiënten en de maatschappij is dit onderzoek van belang, omdat het uitzicht biedt op een nieuwe, minder belastende behandelmethodede bij de ontvangers van een stamceltransplantatie. Dit kan erin resultaten dat bij deze patiënten het risico op korte termijn en lange termijn bijwerkingen van de stamceldepletie wordt gereduceerd en dus zal resulteren in een betere kwaliteit van leven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Carrièremogelijkheden en status kunnen door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Wetenschappelijk is dit project van belang omdat het inzichten verschaft in welke antilichaam eigenschappen resulteren in een kinetiek met een kortere in vivo

halfwaardetijd, in een verbeterde stamceldepletie en na stamceltransplantatie in een hoger percentage stamcel chimaerisme.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.
Voor zover de commissie kan nagaan is er geen sprake van substantiële milieu effecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

De kennis en kunde binnen de instelling en de directe betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de jarenlange ervaring van de instelling met dit type onderzoek en de hiervoor gebruikte proefopzetten en apparatuur.

De DEC concludeert dat de aanvragers voor de uitvoering van de voorgestelde experimenten beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van de voorgestelde dierproeven.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

De doelstellingen van het project zijn gestoeld op een reeds jarenlange ervaring met de gebruikte modellen en meetmethoden. De nu voorgestelde experimentele opzet sluit hier logisch op aan.

Het onderzoek wordt gefaseerd uitgevoerd met duidelijke go/no-go momenten. Na in vitro selectie zullen eerst de PK-karakteristieken worden bepaald. De beste 5 kandidaten zullen, mits de T1/2 meer dan 50% is gereduceerd ten opzichte van een controle preparaat, vervolgens op depletierend vermogen worden getest. De drie beste kandidaten daarvan die een meer dan 2x betere depletie laten zien ten opzichte van een controle preparaat zullen in een transplantatie model worden getest. De keuze voor een >2 verhoogde depletie en een minimaal 50% verkorting van de halfwaardetijd is arbitrair maar zou moeten resulteren in verhoging van het chimaerisme met tenminste 10%. Met name bij kinderen is het noodzakelijk initieel een hoog genoeg chimaerisme te bereiken omdat het aantal stamcellen in de tijd afneemt. Bij patiënten met een laag chimaerisme is er grote kans op een relaps. Dit is een levensbedreigende situatie.

De keuzes voor een substantieel effect zijn navolgbaar en helder onderbouwd. In verder onderzoek (niet in deze aanvraag) zal indien nodig een verdere finetuning plaats vinden.

De verschillende onderdelen van het project zijn allen nodig om uiteindelijk de stap te kunnen maken naar een klinische trial en uiteindelijk toepassing in de kliniek. De indieners hebben veel ervaring in dit onderzoeksveld. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de beschreven doelstellingen. De commissie is daardoor overtuigd van het belang van het voorgestelde onderzoek.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

Er is geen sprake van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De dieren zullen worden gehuisvest conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

Het project bevat een duidelijke beschrijving van de handelingen waarmee elk dier zal worden geconfronteerd. Op basis van de ongerief consequenties van elke individuele interventie zijn daarmee de cumulatieve ongeriefclassificaties herleidbaar.

Door de huisvesting in IVC kooien worden de (immuun-gecompromitteerde) dieren optimaal beschermd tegen het oplopen van infecties.

Binnen het door de indiener uitgevoerde experiment zullen de dieren ongerief ondervinden door het injecteren van antilichaam en het afnemen van bloed.

Het cumulatieve ongerief is onderbouwd en realistisch ingeschat als licht. De commissie is het eens met deze inschatting

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De integriteit van de dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik als proefdier, de beperking van hun natuurlijkgedrag, de genetische modificaties, de interventies en het gedood worden in het kader van het experiment.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw

beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

De handelingen die in het kader van dit project aan de dieren bij de onderzoeker worden uitgevoerd zullen niet resulteren in meer dan licht ongerief. Alle dieren zijn immuun deficiënt. 10.1 c en 10.2 g dieren zijn bij het fokbedrijf reeds sub-lethaal bestraald, wat een extra onderdrukking van de afweer betekent en hebben daarna een humane stamceltransplantatie ondergaan. Het is de verwachting dat tijdens de in dit project voorgestelde experimenten minder dan tot 10% van de dieren een humaan eindpunt zal halen. Deze dieren zijn bevattelijk voor infecties. Zodra de dieren verschijnselen vertonen van ziekte, (gewichtsverlies) zullen ze dagelijks worden vervolgd/gewogen en zullen uit de proef worden genomen zodra het gewichtsverlies meer dan 10% is ten opzichte van het uitgangsgewicht.

De commissie gaat ervanuit (en acht dit ook haalbaar) dat door een intensieve monitoring en het juist toepassen van de aangegeven humane eindpunten in alle gevallen meer dan licht ongerief zal worden voorkomen.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

De dierexperimenten worden pas gestart als in *in-vitro* studies een goede binding van de antilichamen met stamcellen is aangetoond. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Het vermogen van antilichamen om stamcel niches te creëren in beenmerg (met zijn complexe structuur en verschillende type cellen) is niet *in vitro* te bepalen. Ook het vervolgens uitgroeien van donor stamcellen hierin kan alleen *in vivo* onderzocht worden. De mechanismen die bij deze processen een rol spelen zijn te complex om *in vitro* of *in-silico* te modelleren.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

De aantallen experimenten en dus het aantal dieren is gebaseerd op het verwachte aantal nieuw te testen antilichamen. Het betreft voor dit aantal antilichamen een maximum scenario.

De DEC acht de keuzes die er met betrekking tot de aantallen te gebruiken dieren gemaakt zijn voldoende onderbouwd, navolgbaar en realistisch. De extra dieren door mogelijke uitval en de keuze om dieren op verschillende momenten te doden om chimaerisme te bepalen (en niet bloed te verzamelen op verschillende tijdstippen van eenzelfde dier) zijn voldoende onderbouwd.

De commissie is er in haar afweging vanuit gegaan dat de drie variabelen (aantallen experimenten, aantal dieren per experiment en aantal te testen antilichamen) ieder op zich kader stellend zijn.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

De uitvoering van de in dit project beschreven experimenten is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven.

Er wordt binnen de mogelijkheden van het experiment maximaal rekening

gehouden met de diersoort gerelateerde behoeften voor wat betreft huisvesting, verzorging, pijnstilling en toepassing van vroege humane eindpunten. De longitudinale metingen aan hetzelfde dier resulteren in (naast betere resultaten) in het gebruik van minder dieren en door de kleinere interindividuele variatie in kleinere groepsgroottes.

Het uitvoeren van de initiële bestraling en transplantatie van de humane stamcellen bij de fokker die veel ervaring heeft met deze dieren en deze handelingen, kan vanuit het perspectief van risico's voor de dieren ook als een verfijning worden beschouwd.

De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatieplaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.
Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*; zie *bijlage I voor voorbeeld*).

De keuze voor vrouwelijke dieren wordt bepaald door de overwegingen om met dieren van één geslacht te werken (om daarmee de variatie, en dus het aantal dieren te beperken) en het feit dat vrouwelijke dieren beter sociaal te huisvesten zijn en er dientengevolge bij het transport en gedurende de experimenten minder risico's voor de dieren (additioneel ongerief) en het experiment zijn.

Er wordt geen verschil in de uitkomst van de experimenten in mannetjes en vrouwtjes verwacht.

De commissie acht de keuze voor het gebruik van vrouwelijke dieren voldoende onderbouwd.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Alle dieren worden na afloop van het project gedood. Een deel van de dieren is niet bruikbaar voor andere doeleinden (appendix 1). De overige dieren worden gedood omdat het beenmerg van de dieren geanalyseerd moet worden op aanwezigheid van donor stamcellen. De dieren worden gedood met een dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.
Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

Rechtvaardigt het belang van het testen in muizen van nieuwe antilichamen met betere eigenschappen voor het verwijderen van humane stamcellen, voorafgaand aan een stamceltransplantatie, de aantasting van hun integriteit en het ongerief dat de dieren daardoor wordt aangedaan en is bij de uitvoering van deze experimenten aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

Alle dieren (453) ondervinden licht ongerief ten gevolge van het injecteren van de antilichamen en de stamcellen en van de bloedafnames en zullen na afloop van het experiment worden gedood. Bij alle dieren is sprake van een aantasting van hun integriteit.

De doelstellingen kunnen niet zonder het gebruik van dieren behaald worden. De onderzoekers hebben alle maatregelen en voorzorgen genomen om onnodig lijden van de dieren te voorkomen en het aantal dieren te beperken

Een weinig belastende, snellere en voldoende depletie van stamcellen als voorbereiding op een (10.1 c en 10.2 g) hematopoïetische stamceltransplantatie zal de kwaliteit van leven tijdens en na de behandeling van patiënten met een genetische afwijking in hun hematopoïetische cellen verbeteren. Dit betekent ook dat de belasting voor de zorg van deze patiënten zal verminderen (maatschappelijk belang).

In wetenschappelijke zin levert dit project kennis op over welke eigenschappen bepalen of antilichamen in vivo beter geschikt zijn voor het depletieren van stamcel populaties.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke en klinische inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke en klinische reputatie, wat vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Carrière mogelijkheden en status kunnen door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke wetenschappelijke en maatschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Onderzoek naar behandelingen voor patiënten met een genetische afwijking in hun

hematopoiëtische stamcellen past bij de missie van de instelling.

De commissie acht het belang van dit onderzoek substantieel.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling: het testen in muizen van nieuwe humane antilichamen met betere eigenschappen voor het depletieren van humane stamcellen.

Het uiteindelijk doel is deze antilichamen beschikbaar te maken voor toepassing in de kliniek en daarmee de kwaliteit van leven te verbeteren voor de groep patiënten die door een genetische afwijking in hun hematopoiëtische stamcellen aangewezen zijn op een stamceltransplantatie. Deze doelstelling vertegenwoordigt een substantieel belang voor de betreffende patiënten en de maatschappij. De DEC is overtuigd van de kwaliteit van het onderzoek en de uitvoering hiervan.

Vanwege de inherente onzekerheid over het aantal nieuwe antilichamen die beschikbaar komen en het aantal antilichamen dat alle experimenten zal doorlopen is er door de indieners voor wat betreft het aantal te testen antilichamen, het aantal experimenten en het aantal dieren uitgegaan van een maximum scenario. De commissie is er in haar afweging vanuit gegaan dat naast het maximaal aantal dieren ook het aantal te testen antilichamen per fase van het onderzoek en het aantal experimenten per antilichaam kader stellend zijn.

De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat voorkomen wordt dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten zullen ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van mening dat aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent de 3 V's en de kwaliteit van het onderzoek is voldaan en dat het hierboven genoemde belang voor de wetenschap, de betreffende patiëntengroep en de samenleving als geheel het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van welzijn en integriteit) rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd - zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2 .e. en g

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD **10.2 .e. en g** 202010607
Bijlagen
3

Datum 13 oktober 2020
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte **10.2 .e. en g**

Op 7 augustus 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Creating a low-risk strategy for rapid and efficient engraftment after hematopoietic stem cell transplantation" met aanvraagnummer AVD **10.2 .e. en g** 202010607. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 13 oktober 2020 tot en met 30 september 2025.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie **10.2 .e. en g** (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 14 september 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 2 oktober 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de keuze om enkel met vrouwtjesdieren te werken en de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

13 oktober 2020

Aanvraagnummer:

AVD [REDACTED] 202010607

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

13 oktober 2020

Aanvraagnummer:

AVC 202010607

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

10.2 .e. en g

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 oktober 2020 tot en met 30 september 2025, voor het project "Creating a low-risk strategy for rapid and efficient engraftment after hematopoietic stem cell transplantation" met aanvraagnummer AVD ^{10.2 .e. en g} 202010607, na advies van dierexperimentencommissie ^{10.2 .e. en g}.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is ^{10.2 .e. en g}

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 7 augustus 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 14 september 2020;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 7 oktober 2020;
 - c Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 14 september 2020
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 7 oktober 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Determination of PK values			
	Muizen (Mus musculus)	105	100,0% Licht
3.4.4.2. Hematopoietic stem cell depletion assay			
	Muizen (Mus musculus)	180	100,0% Licht
3.4.4.3 Hematopoietic stem cell transplantation			
	Muizen (Mus musculus)	168	100,0% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Aanvraagnummer:

AVD XXXXXXXXXX 202010607

- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:
AVD XXXXXXXXXX 202010607

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:
AVD XXXXXXXXXX 202010607

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Form

Project proposal• This form should be used to write the project proposal of animal procedures.

- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Rescue of CMT-aaRS mouse models by overexpression of cognate tRNA

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
		<input type="checkbox"/> Translational or applied research
		<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
		<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
		<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures

-
- Higher education or training
 - Forensic enquiries
 - Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures
-

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is characterized by selective degeneration of peripheral motor and sensory nerves, leading to progressive muscle weakness and loss of sensation in feet and hands [1]. With a prevalence of 1:2500, CMT is the most common inherited neuromuscular disorder [2, 3], and, to date, no drugs with proven efficacy (EMA- or FDA- approved) are available. Heterozygous (in one of two gene copies) mutations in six distinct genes encoding cytoplasmic aminoacyl tRNA synthetases (aaRSs) have been identified as a genetic cause of CMT [4]: glycyl- (GlyRS) [6-15], tyrosyl- (TyrRS) [16,17], alanyl- (AlaRS) [18-23], histidyl- (HisRS) [24,25], methionyl- (MetRS) [17,26,27] and tryptophanyl-tRNA synthetase (TrpRS)[5]. aaRSs are enzymes that attach amino acids to their tRNAs (tRNA aminoacylation), thus mediating the first step of protein synthesis [28,29]. The molecular mechanisms through which mutations in aaRSs result in degeneration of peripheral motor and sensory nerves are poorly understood. Furthermore, despite several decades of intensive research, the reason why only peripheral motor and sensory nerves are affected is incompletely unraveled. Using fruit fly (*Drosophila melanogaster*) and mouse models we already successfully set out to shed light on the molecular mechanisms underlying the degeneration of peripheral motor and sensory nerves in CMT-aaRS. To this end, we have previously generated and characterized models for CMT caused by mutations in TyrRS (CMT-TyrRS) and GlyRS (CMT-GlyRS) in the fruit fly *Drosophila melanogaster*, which recapitulate several of the typical symptoms of the human disease, including progressive motor deficits, evidence of neuronal dysfunction provided by electrophysiological measurements, nerve degeneration, morphological defects of sensory neurons and neuromuscular junctions, and progressive muscle denervation with distal muscles being more severely affected [30,31]. The use of a novel method which allows to cell-type-specifically monitor protein synthesis in living fruit flies [31,32], revealed that selective expression of each of six distinct GlyRS or TyrRS mutants in either motor or sensory neurons substantially reduced protein synthesis [31]. Based on these unprecedented novel insights, we postulate that impaired protein synthesis may constitute a common pathogenic mechanism underlying CMT-aaRS.

Based on our findings, a new key question emerged: what is the molecular mechanism that underlies inhibition of protein synthesis by CMT-mutant aaRSs? We observed that transgenic overexpression of tRNA^{Gly} fully rescued the protein synthesis defect and CMT-related phenotypes in *Drosophila* CMT-GlyRS models. We hypothesized that CMT-mutant GlyRS proteins fail to release tRNA^{Gly}, or release tRNA^{Gly} at a very slow rate. As a consequence, the supply of aminoacylated tRNA^{Gly} to the ribosome may drop below a critical threshold, causing the ribosome to stall on Gly codons, thus inhibiting protein synthesis.

Our goal is to strengthen the potential relevance of our findings in *Drosophila* and GlyRS CMT-mutant mice for human CMT, so that we can rationally design an effective treatment for this incurable disease. *Drosophila* is an invertebrate model that is evolutionary distant from humans. Therefore, in order to translate our findings in *Drosophila* towards human CMT-aaRS, experiments in vertebrate models for CMT-aaRS are an essential intermediate step. Indeed, vertebrate models are evolutionary much closer to humans, what is reflected in a substantially higher similarity to humans, both anatomically and genetically.

In addition to CMT-GlyRS fly models, CMT-GlyRS models were also generated in the mouse as described by Achilli et al., 2009 (C201R mutation) and Morelli et al., 2019 (Δ ETAQ mutation) [33, 34]. To date, they count as evolutionary closest to human mouse models for CMT-GlyRS, and they almost fully recapitulate the behavioral symptoms and neuropathological hallmarks of human CMT-aaRS. The heterozygous mutant mice develop progressive, length-dependent degeneration of peripheral motor and sensory axons, recapitulating several hallmarks of human CMT-GlyRS, including NMJ morphology defects, endplate denervation, impaired neuromuscular transmission, reduced nerve conduction velocities, and loss of large diameter peripheral motor and sensory axons, leading to overt neuromuscular dysfunction [33,34]. Thus, these mouse models are the most disease-relevant preclinical models for CMT-aaRS published so far. In our previously approved project (Project AVD1030020184826) we started to study the molecular mechanism underlying the inhibition of protein synthesis by use these two CMT-GlyRS models and to explore the effect of tRNA^{Gly/+} overexpression on the peripheral neuropathy phenotype. We were able to confirm our aforementioned hypothesis on the underlying molecular mechanism and to rescue the peripheral neuropathy phenotypes in the Gars^{C201R/+} mouse model by tRNA^{Gly/+} overexpression.

In addition, we also found an activation of the integrated stress response (ISR) in the CMT-GlyRS mouse model heterozygous for the C201R mutation in the GlyRS gene. The ISR is a highly conserved cell stress pathway found in all eukaryotic cells that can be triggered by a variety of cell stressors. Activation of the ISR results in phosphorylation of the translation initiation factor, eIF2 α . eIF2 α functions in the early steps of protein synthesis and phosphorylation of eIF2 α results in downregulation of global translation [48, 49]. Accordingly, evaluating phosphorylation of eIF2 α is a way to study the activation of the ISR.

The suggested molecular mechanism for CMT-GlyRS may more broadly apply to CMT-aaRS.

Apart from CMT-GlyRS mouse models, a CMT-TyrRS (Yars^{E196K/E196K} and Yars^{E196K/+}) mouse model has recently been generated by [10.2 .e. en g] (y). Mice heterozygous for the E196K mutation develop peripheral neuropathy phenotypes from ~8 months of age onwards, while homozygous mice develop peripheral neuropathy from ~4 months of age onwards (Burgess lab, manuscript in preparation).

Preliminary data in our *Drosophila* CMT-TyrRS models show that tRNA^{Tyr/+} overexpression rescues peripheral neuropathy phenotypes. Since the mentioned CMT-TyrRS model (Yars^{E196K}) is evolutionary closer to human, evaluation of a crossbreed of these mice with tRNA^{Tyr/+} overexpression mice would provide unprecedented complementing insight into the molecular mechanisms underlying CMT and further verify our abovementioned theory. To this end we would like to generate a tRNA^{Tyr-high/+} (high copy number of tRNA^{Tyr}) and a tRNA^{Tyr-low/+} (low copy number of tRNA^{Tyr}) overexpression mouse model.

Furthermore, our data indicate that tRNA^{Gly/+} overexpression may constitute a novel therapeutic approach for CMT2D, the subtype of CMT which is caused by dominant mutations in GlyRS (CMT-GlyRS) and characterized by primary axonal degeneration [33]. The next step towards rational drug design for this dreadful disease is the development of a therapy. We plan to evaluate the therapeutic potential of [10.1 c en 10.2 g] a CMT-GlyRS mouse model. Therefore, we plan to use (i) [10.1 c en 10.2 g]

(ii) AAV9-mediated gene transfer of tRNA^{Gly}.

We plan to evaluate the therapeutic potential of [10.1 c en 10.2 g]. The advantage of such an approach is that administration can simply be stopped in case adverse events would occur. Different types of [10.1 c en 10.2 g] over a wide [10.1 c en 10.2 g] range ([10.1 c en 10.2 g]) can be efficiently [10.1 c en 10.2 g], and [10.1 c en 10.2 g] can be customized for the specific application and target

cell type of interest. This approach can in principle target any cell type and from our previous data we expect to rescue the peripheral neuropathy phenotype of CMT-GlyRS mice by **10.1 c en 10.2 g**.

Adeno-associated viral (AAV) vectors are a very promising approach for gene delivery in neurological disease, among others because it has a low risk of insertional mutagenesis and maintains exogenous gene expression for extended periods (>1 year) [35]. AAV serotype 9 mediates efficient gene delivery to motor neurons throughout the spinal cord, as well as sensory neurons in dorsal root ganglia [36, 37]. Furthermore, AAV9 successfully induced therapeutic effects in mouse models of the motor neurodegenerative diseases CMT-GlyRS [38], ALS [39 - 41], SMA [42 - 45] and SMARD1 [46], and it has already been used in human, e.g. in SMA patients where AAV9-SMN induced therapeutic effects [47].

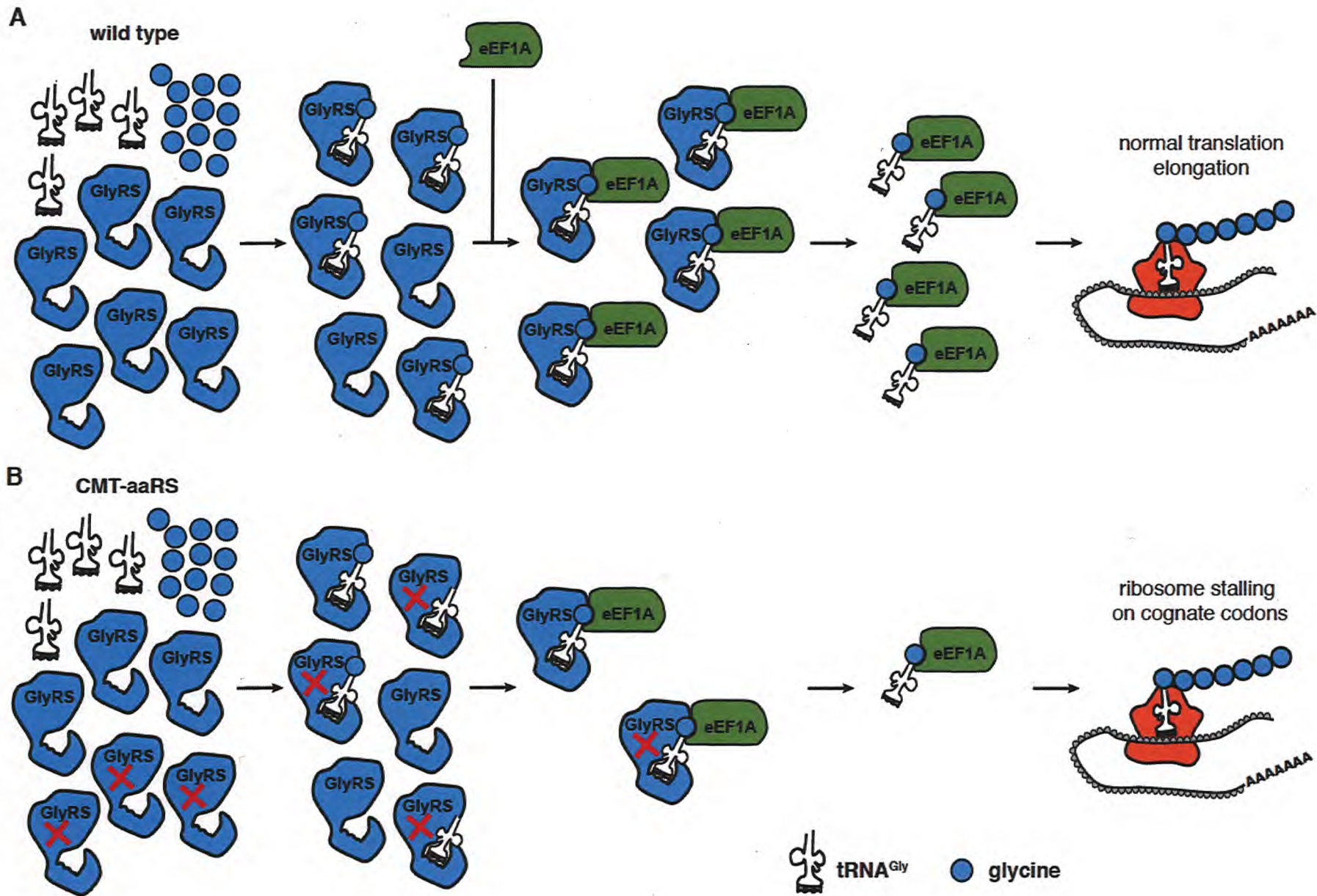


Figure: Proposed molecular mechanism underlying CMT2D. (A) In the wild type situation, GlyRS binds tRNAGly and glycine, activates glycine, and aminoacylates tRNAGly with glycine. Glycyl-tRNAGly is transferred to eEF1A, which delivers glycyl-tRNAGly to the ribosome for use during translation elongation. (B) In CMT2D, both wild type and CMT-mutant (labeled with red cross) GlyRS are present, derived from the wild type and CMT-mutant GARS alleles, respectively. CMT-mutant GlyRS binds tRNAGly and possibly glycine, may or may not activate glycine and aminoacylate tRNAGly, but fails to release tRNAGly or releases at a very slow pace. As a consequence, the cellular tRNAGly pool is reduced under a critical threshold, and insufficient tRNAGly is available for aminoacylation by the wild type GlyRS. This results in insufficient supply of glycyl-tRNAGly to the ribosome, and stalling of the ribosome on Gly codons.

References:

1. Dyck PJ. 1993. Peripheral Neuropathy Philadelphia: Saunders Company.
2. Martyn CN, Hughes RA. 1997. Epidemiology of peripheral neuropathy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 62: 310-8.
3. Barreto LC, Oliveira FS, Nunes PS, de França Costa IM, Garcez CA, Goes GM, Neves EL, de Souza Siqueira Quintans J, de Souza Araújo AA. 2016. Epidemiologic Study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A Systematic Review. *Neuroepidemiology*. 46:157-165.
4. Wei N, Zhang Q, Yang XL. 2019. Neurodegenerative Charcot-Marie-Tooth disease as a case study to decipher novel functions of aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem*. 294: 5321-5339.
5. Tsai PC, Soong BW, Mademan I, Huang YH, Liu CR, Hsiao CT, Wu HT, Liu TT, Liu YT, Tseng YT, Lin KP, Yang UC, Chung KW, Choi BO, Nicholson GA, Kennerson ML, Chan CC, De Jonghe P, Cheng TH, Liao YC, Züchner S, Baets J, Lee YC. 2017. A recurrent WARS mutation is a novel cause of autosomal dominant distal hereditary motor neuropathy. *Brain*. 140: 1252-1266.
6. Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, Puls I, et al. 2003. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-MarieTooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet* 72: 1293-9.
7. Sivakumar K, Kyriakides T, Puls I, Nicholson GA, et al. 2005. Phenotypic spectrum of disorders associated with glycyl-tRNA synthetase mutations. *Brain* 128: 2304-14.
8. James PA, Cader MZ, Muntoni F, Childs AM, et al. 2006. Severe childhood SMA and axonal CMT due to anticodon binding domain mutations in the GARS gene. *Neurology* 67: 1710-2.
9. Del Bo R, Locatelli F, Corti S, Scarlato M, et al. 2006. Coexistence of CMT-2D and distal SMA-V phenotypes in an Italian family with a GARS gene mutation. *Neurology* 66: 752-4.
10. Rohkamm B, Reilly MM, Lochmuller H, Schlotter-Weigel B, et al. 2007. Further evidence for genetic heterogeneity of distal HMN type V, CMT2 with predominant hand involvement and Silver syndrome. *J Neurol Sci* 263: 100-6.
11. Abe A, Hayasaka K. 2009. The GARS gene is rarely mutated in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Hum Genet* 54: 310-2.
12. Lee HJ, Park J, Nakhro K, Park JM, et al. 2012. Two novel mutations of GARS in Korean families with distal hereditary motor neuropathy type V. *J Peripher Nerv Syst* 17: 418-21.
13. Kawakami N, Komatsu K, Yamashita H, Uemura K, et al. 2014. A novel mutation in glycyl-tRNA synthetase caused Charcot-Marie-Tooth disease type 2D with facial and respiratory muscle involvement. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology* 54: 911-5.
14. Sun A, Liu X, Zheng M, Sun Q, et al. 2015. A novel mutation of the glycyl-tRNA synthetase (GARS) gene associated with Charcot-Marie-Tooth type 2D in a Chinese family. *Neurol Res* 37: 782-7.
15. Liao YC, Liu YT, Tsai PC, Chang CC, et al. 2015. Two Novel De Novo GARS Mutations Cause Early-Onset Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease. *PLoS One* 10: e0133423.
16. Jordanova A, Irobi J, Thomas FP, Van Dijck P, et al. 2006. Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat Genet* 38: 197-202.

17. Hyun YS, Park HJ, Heo SH, Yoon BR, et al. 2014. Rare variants in methionyl- and tyrosyl-tRNA synthetase genes in late-onset autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Clinical genetics* 86: 592-4.
18. Latour P, Thauvin-Robinet C, Baudalet-Mery C, Soichot P, et al. 2010. A major determinant for binding and aminoacylation of tRNA(Ala) in cytoplasmic Alanyl-tRNA synthetase is mutated in dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 86: 77-82.
19. Lin KP, Soong BW, Yang CC, Huang LW, et al. 2011. The mutational spectrum in a cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 among the Han Chinese in Taiwan. *PLoS One* 6: e29393.
20. Motley WW, Griffin LB, Mademan I, Baets J, et al. 2015. A novel AARS mutation in a family with dominant myeloneuropathy. *Neurology* 84: 2040-7.
21. Bansagi B, Antoniadi T, Burton-Jones S, Murphy SM, et al. 2015. Genotype/phenotype correlations in AARS-related neuropathy in a cohort of patients from the United Kingdom and Ireland. *J Neurol* 262: 1899-908.
22. Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, Sakiyama Y, et al. 2012. Alanyl-tRNA synthetase mutation in a family with dominant distal hereditary motor neuropathy. *Neurology* 78: 1644-9.
23. McLaughlin HM, Sakaguchi R, Giblin W, Wilson TE, et al. 2012. A recurrent loss-of-function alanyl-tRNA synthetase (AARS) mutation in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 2N (CMT2N). *Hum Mutat* 33: 24453.
24. Safka Brozkova D, Deconinck T, Griffin LB, Ferbert A, et al. 2015. Loss of function mutations in HARS cause a spectrum of inherited peripheral neuropathies. *Brain* 138: 2161-72.
25. Vester A, Velez-Ruiz G, McLaughlin HM, Lupski JR, et al. 2013. A loss-of-function variant in the human histidyl-tRNA synthetase (HARS) gene is neurotoxic in vivo. *Hum Mutat* 34: 191-9.
26. Gonzalez M, McLaughlin H, Houlden H, Guo M, et al. 2013. Exome sequencing identifies a significant variant in methionyl-tRNA synthetase (MARS) in a family with late-onset CMT2. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 84: 1247-9.
27. Nam SH, Hong YB, Hyun YS, Nam da E, et al. 2016. Identification of Genetic Causes of Inherited Peripheral Neuropathies by Targeted Gene Panel Sequencing. *Mol Cells* 39: 382-8.
28. Schimmel P. 1987. Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. *Annual review of biochemistry* 56: 125-58.
29. Ibba M, Soll D. 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annual review of biochemistry* 69: 617-50.
30. Storkebaum E, Leitao-Goncalves R, Godenschwege T, Nangle L, et al. 2009. Dominant mutations in the tyrosyl-tRNA synthetase gene recapitulate in *Drosophila* features of human Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11782-7.
31. Niehues S, Bussmann J, Steffes G, Erdmann I, et al. 2015. Impaired protein translation in *Drosophila* models for Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mutant tRNA synthetases. *Nature communications* 6: 7520.
32. Erdmann I, Marter K, Kobler O, Niehues S, et al. 2015. Cell-selective labelling of proteomes in *Drosophila melanogaster*. *Nature communications* 6: 7521.
33. Achilli F, Bros-Facer V, Williams HP, Banks GT, et al. 2009. An ENU-induced mutation in mouse glycyl-tRNA synthetase (GARS) causes peripheral sensory and motor phenotypes creating a model of Charcot-Marie-Tooth type 2D peripheral neuropathy. *Dis Model Mech* 2: 359-73.
34. Morelli KH, Griffin LB, Pyne NK, Wallace LM, et al. 2019. Allele-specific RNA interference prevents neuropathy in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D mouse models. *J Clin Invest*. 129:5568-5583.
35. Tosolini AP, Sleigh JN. 2017. Motor Neuron Gene Therapy: Lessons from Spinal Muscular Atrophy for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 10:405.
36. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, et al. 2009. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol*. 27(1):59-65.

37. Snyder BR, Gray SJ, Quach ET, Huang JW, et al. 2011. Comparison of adeno-associated viral vector serotypes for spinal cord and motor neuron gene delivery. *Hum Gene Ther.* 22(9):1129-35.
38. Morelli KH, Griffin LB, Pyne NK, Wallace LM, et al. 2019. Allele-specific RNA interference prevents neuropathy in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D mouse models. *J Clin Invest.* 129(12):5568-5583.
39. Foust KD, Salazar DL, Likhite S, Ferraiuolo L, et al. 2013. Therapeutic AAV9-mediated suppression of mutant SOD1 slows disease progression and extends survival in models of inherited ALS. *Mol Ther.* 21(12):2148-59.
40. Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, et al. 2013. Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons. *EMBO molecular medicine.* 5(11):1710-9.
41. Wang Y, Duan W, Wang W, Di W, et al. 2016. scAAV9-VEGF prolongs the survival of transgenic ALS mice by promoting activation of M2 microglia and the PI3K/Akt pathway. *Brain Res.;1648(Pt A):1-10.*
42. Passini MA, Bu J, Richards AM, Treleaven CM, et al. 2014. Translational fidelity of intrathecal delivery of self-complementary AAV9-survival motor neuron 1 for spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther.* 25(7):619-30.
43. Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, et al. 2010. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol.* 28(3):271-4.
44. Meyer K, Ferraiuolo L, Schmelzer L, Braun L, et al. 2015. Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: a dose-response study in mice and nonhuman primates. *Mol Ther.;23(3):477-87.*
45. Powis RA, Karyka E, Boyd P, Come J, et al. 2016. Systemic restoration of UBA1 ameliorates disease in spinal muscular atrophy. *JCI Insight.* 1(11):e87908.
46. Shababi M, Feng Z, Villalon E, Sibigroth CM, et al. 2016. Rescue of a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy With Respiratory Distress Type 1 by AAV9-IGHMBP2 Is Dose Dependent. *Mol Ther.* 24(5):855-66.
47. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, et al. 2017. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med.* 377(18):1713-22.
48. Sonenberg N, Hinnebusch AG. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136:731-745.
49. Holcik M, Sonenberg N. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6:318-327.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The main objective of this proposal is to gain a better understanding of the molecular basis of CMT-aaRS. This concerns the molecular mechanisms through which mutations in tRNA synthetases give rise to the peripheral neuropathy phenotypes that are characteristic for CMT-aaRS and the rescue of these particular phenotypes by cognate tRNA overexpression. In particular, this proposal is expected to promote our goal of rational drug design for this incurable disease. The specific aims of this proposal are:

Aim 1. To evaluate whether the protein synthesis defect that we identified in CMT-aaRS *Drosophila* models is also present and particularly pronounced in motor and sensory neurons in CMT-TyrRS mouse models, a novel disease-relevant preclinical model.

Aim 2. To evaluate whether eIF2 α phosphorylation levels are altered in CMT-TyrRS mouse models. Increased eIF2 α phosphorylation is known to inhibit translation initiation, and constitutes a key upstream regulatory mechanism of protein synthesis.

Aim 3. To further test the above described hypothesis that next to CMT-GlyRS also CMT-TyrRS is caused by defective release of the aminoacylated tRNA^{Tyr} from TyrRS, due to net addition of positive charge to TyrRS by the majority of CMT-causing mutations. Specifically, we will evaluate whether (i) the ribosome transit rate (translation elongation rate) is reduced in CMT-TyrRS mouse models, (ii) whether the ribosome stalls on tyrosine codons in motor neurons of CMT-TyrRS mouse models, and (iii) whether tRNA^{Tyr}/+ overexpression rescues peripheral neuropathy symptoms and protein synthesis defects of the CMT-TyrRS mouse model.

Aim 4. To develop a **10.2 e. en g** technique in CMT-GlyRS mouse models for a novel therapeutic approach for CMT2D. These objectives are achievable, as we have over 20 years of experience with mouse neurobiological experiments [1-8], and the majority of the methods used are standard methods in our lab. Furthermore, we have a state-of-the-art animal facility with all necessary equipment, and we are in close contact with animal welfare officers to ensure minimum negative effects of the experiments on animals. For the proposed experiments, research funding was obtained from the ERC (European Research Council) and JPND (EU Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research).

References:

1. Picchiarrelli G, Demestre M, Zuko A, Been M, Higelin J, Dieterlé S, Goy MA, Mallik M, Sellier C, Scekic-Zahirovic J, Zhang L, Rosenbohm A, Sijlmans C, Aly A, Mersmann S, Sanjuan-Ruiz I, Hübers A, Messaddeq N, Wagner M, van Bakel N, Boutillier AL, Ludolph A, Lagier-Tourenne C, Boeckers TM, Dupuis L, Storkebaum E. 2019. FUS-mediated regulation of acetylcholine receptor transcription at neuromuscular junctions is compromised in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci.* 22:1793-1805.
2. Storkebaum E, Ruiz de Almodovar C, Meens M, Zacchigna S, et al. 2010. Impaired autonomic regulation of resistance arteries in mice with low vascular endothelial growth factor or upon vascular endothelial growth factor trap delivery. *Circulation* 122: 273-81.
3. Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, et al. 2005. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* 8: 85-92.
4. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, et al. 2004. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429: 413-7.
5. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, et al. 2003. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 34: 383-94.
6. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, et al. 2001. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 28: 131-8.
7. Scekic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, et al. 2017. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.*
8. Scekic-Zahirovic J, Sendscheid O, El Oussini H, Jambau M, et al. 2016. Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J.* 35(10):1077-97

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

CMT is an incurable disease for which currently no FDA-approved drug treatment is available. This is at least in part due to the fact that the molecular mechanisms underlying this disease are incompletely understood, as well as the mechanisms underlying the cell-type-specific nature of the disease (selective degeneration of peripheral motor and sensory nerves). In a previous study, we already set out to identify the molecular mechanism by which CMT-mutant GlyRS inhibit translation and were able to rescue the peripheral neuropathy phenotypes of CMT-mutant *Gars*^{C201R/+} mice by crossbreeding these mice with tRNA^{Gly} overexpression mice. The proposed project will provide unprecedented complementing insight into the molecular mechanisms underlying CMT, and the reason for the selective degeneration of peripheral motor and sensory nerves in CMT. Most importantly, this project may constitute the next step towards rational drug design for this dreadful disease.

3.4 Research Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

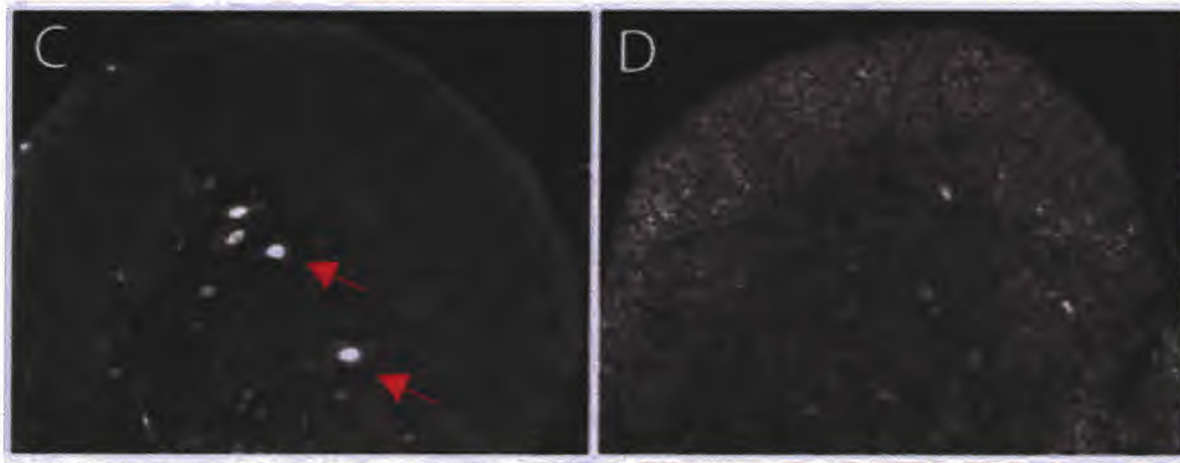
Aim	DAP experiment #	DAP experiment name	Procedure category
1	1	FUNCAT in motor neurons	mild
	2	FUNCAT in sensory neurons	mild
	3	FUNCAT in glutamatergic excitatory neurons	mild
	4	FUNCAT in astrocytes	mild
2	9.1	Western blot (eIF2 α phosphorylation levels)	mild
	9.2	Immunohistochemistry (eIF2 α phosphorylation levels)	mild
3	10	Northern blotting	mild
	11	Ribosome transit rate	mild
	12	Ribosome footprinting	mild
	13	Effect of tRNA ^{Tyr/+} overexpression on peripheral neuropathy phenotypes of Yars ^{E196K/E196} and Yars ^{E196K/+} mice	mild
	5	FUNCAT with tRNA ^{Tyr/+} overexpression	mild
4	14	10.1 c en 10.2 g	moderate
	15		moderate
	16		moderate
	6		moderate
	17	Evaluation of the effect of AAV9-U6-tRNAGly-GCC administration in P0 Gars ^{C201R/+} mice	moderate
	18	Longitudinal evaluation of the effect of AAV9-U6-tRNAGly-GCC administration in P0 Gars ^{C201R/+} mice	moderate
	7	FUNCAT after AAV9-U6-tRNAGly-GCC administration in P0 Gars ^{C201R/+} mice	moderate
	19	Evaluation of the effect of AAV9-U6-tRNAGly-GCC administration in 4 weeks old Gars ^{C201R/+} mice	moderate
	20	Longitudinal evaluation of the effect of AAV9-U6-tRNAGly-GCC administration in 4 weeks old Gars ^{C201R/+} mice	moderate
	8	FUNCAT after AAV9-U6-tRNAGly-GCC administration in 4 weeks old Gars ^{C201R/+} mice	moderate

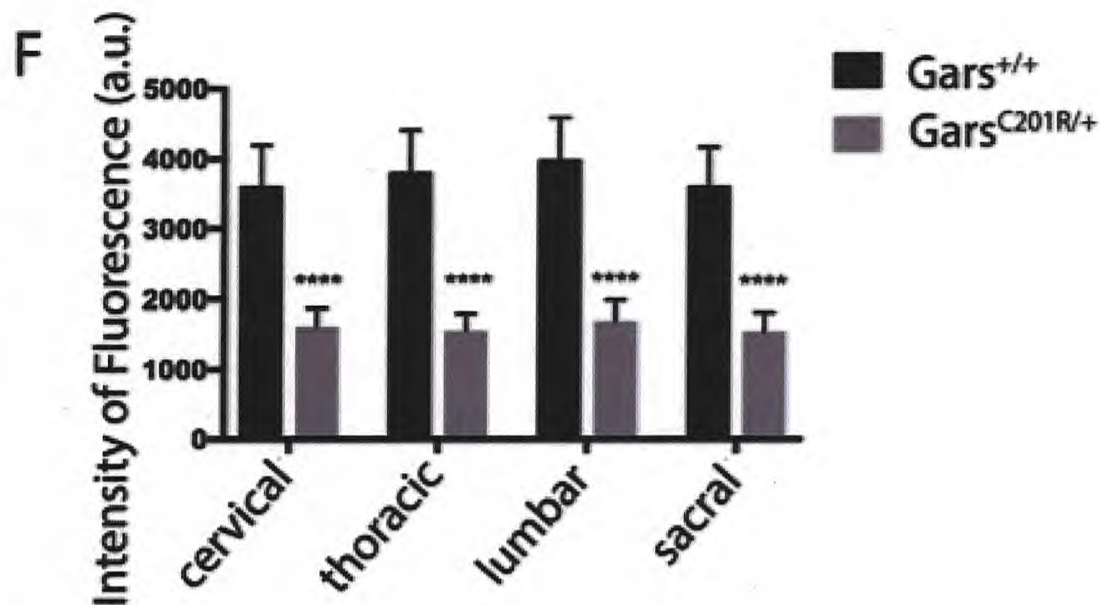
In order to achieve the specific aims of this proposal, we will:

Aim 1. Use fluorescent non-canonical amino acid tagging (FUNCAT) to evaluate whether protein synthesis is inhibited in motor and sensory neurons of CMT-GlyRS mouse models.

FUNCAT is a novel technique that allows labeling of newly synthesized proteins (NSPs) with a non-canonical amino acid, such as azidonorleucine (ANL). ANL can be incorporated in proteins instead of methionine by a modified methionyl-tRNA synthetase (MetRS*). It is possible to express MetRS* only in specific cell types, such as motor and sensory neurons. This enables labeling of NSPs with ANL in particular cell types. Subsequently, ANL can be labeled with a fluorophore by a process called "click chemistry" and microscopically analysed. FUNCAT can be used to determine the protein synthesis rate. The advantage of FUNCAT technology over existing methods is the cell-type-specific labeling of NSPs in living fruit flies or mice [1-3].

It is possible to do quantitative measurements with FUNCAT. FUNCAT fluorescently labels the NSPs, and the amount of NSPs is proportional to the fluorescence intensities within single cells, which can be determined by fluorescent microscopy. In panel C you can see brightly stained cells (red arrow) representing NSPs within motor neurons of the spinal cord of wild-type mice. In panel D, no brightly stained cells are identified in the motor neurons of the spinal cord of GarsC201R/+ mice. The intensity per cell can be quantified and an average of a number of cells per genotype is represented in a graph. In panel F the difference between wild-type and GarsC201R/+ animals is very significant ($P < .0001$).





FUNCAT will be used to determine whether protein synthesis is affected in motor and sensory neurons of CMT-TyrRS mouse models in vivo. An existing CMT-TyrRS model with a E196K mutation in the Yars gene will be used. Heterozygous mice develop peripheral neuropathy phenotypes from ~8 months of age onward, while homozygous mice develop peripheral neuropathy from ~4 months of age onward (Burgess lab, manuscript in preparation).

Mice that allow for cell-type-specific expression of the modified MetRS transgene and thereby enabling non-canonical amino acid tagging (NCAT) in mice, were provided by Dr. Erin Schuman [3]. A floxed stop sequence precedes the modified MetRS (MetRS*), which allows selective expression of the MetRS* transgene in cre-expressing cells.

To study protein synthesis in motor and sensory neurons – the two disease-affected cell types – of CMT-TyrRS, we will cross the NCAT mice to mice expressing cre in motor neurons (ChAT^{cre} [4]) or in sensory neurons (NFL^{creER} [5]), respectively. The resulting double transgenic mice will subsequently be crossed to homozygous or heterozygous CMT-TyrRS mice (Yars^{E196K/E196K} or Yars^{E196K/+} mice). These mice will be used for FUNCAT in motor and sensory neuron cell bodies, and compared to littermate controls which carry the cre and MetRS* transgenes but are wild type for TyrRS (animal procedure/experiments 1 and 2 in the DAP, see also Table 1).

To determine whether the cell-type-specific nature of CMT-TyrRS (selective degeneration of peripheral motor and sensory nerves) is due to the fact that the protein synthesis defect is more pronounced in motor and sensory neurons as compared to other neuronal and non-neuronal cell types, we will perform FUNCAT in glutamatergic excitatory neurons in the forebrain (Camk2a^{cre} [6]), and astrocytes (GFAP^{cre} [7, 8]) of Yars^{E196K/E196K} and Yars^{E196K/+} mice and their littermate controls (animal procedure/experiments 3 and 4 in the DAP, see also Table 1).

Aim 2. Use western blot and immunohistochemistry on spinal cord and dorsal root ganglia to evaluate whether eIF2a phosphorylation levels are

altered in Yars^{E196K/E196} (4 months of age) and Yars^{E196K/+} (8 months of age) mice and their respective littermate controls (animal procedure/experiment 9 in the DAP, see also Table 1).

Aim 3. To test our working model, we will:

(i) generate and characterize mice overexpressing tRNA^{Tyr} by carrying several copies of a transgene that contains a cluster of three tRNA^{Tyr} genes. Thereby, we will distinguish between tRNA^{Tyr-high/+} (high copy number of tRNA^{Tyr}) and tRNA^{Tyr-low/+} (low copy number of tRNA^{Tyr}) transgenic mouse lines. To quantify the level of tRNA^{Tyr/+} overexpression, Northern blotting will be used (animal procedure/experiment 10 in the DAP, see also Table 1).

(ii) determine whether translation elongation is affected in Yars^{E196K/E196}; tRNA^{Tyr/+} and Yars^{E196K/+}; tRNA^{Tyr/+} mice and their littermate controls, by monitoring the ribosome transit rate in spinal cord samples, using a ribosome run-off assay [9,10] (animal procedure/experiment 11 in the DAP, see also Table 1).;

(iii) determine whether ribosomes stall on tyrosine codons in motor neurons of CMT-TyrRS mouse models. To this end, the two techniques 'translating ribosome affinity purification' (TRAP) [11] and 'ribosome profiling' [12] will be combined. Specifically, RiboTag mice, which carry an cre-dependent modification of the ribosomal protein Rpl22 allele, will be crossed to ChAT^{cre} mice [4]. Cre recombinase activates the expression of an epitopetagged ribosomal protein RPL22^{HA}. Crossing the RiboTag mice to ChAT^{cre} will result in selective expression of RPL22^{HA} in motor neurons. As RPL22^{HA} is incorporated in ribosomes, a HA antibody can be used to immunoprecipitate ribosomes together with ribosome-associated mRNA from motor neurons. The resulting double transgenic mice will subsequently be crossed to Yars^{E196K/E196} or Yars^{E196K/+} mice, yielding ChAT-cre/+; Rpl22^{HA}/+; Yars^{E196K/E196K} and ChAT-cre/+; Rpl22^{HA}/+; Yars^{E196K/+} and ChAT-cre/+; Rpl22^{HA}/+ littermate controls. Spinal cords from these mice will be rapidly dissected and snap frozen in liquid nitrogen (animal procedure/experiment 12 in the DAP, see also Table 1). Frozen spinal cords will then be shipped to our collaborator Dr. Marina Chekulaeva (MDC for Molecular Medicine, Berlin, Germany), who will perform the ribosome footprinting assay according to a published protocol [13].

(iv) evaluate whether tRNA^{Tyr/+} overexpression rescues peripheral neuropathy symptoms and protein synthesis defects of CMT-TyrRS mouse models. To evaluate whether peripheral neuropathy symptoms of Yars^{E196K} mice are mitigated by tRNA^{Tyr/+} overexpression, tRNA^{Tyr/+} transgenic mice will be crossed to Yars^{E196K/E196K} and Yars^{E196K/+} mice. For the resulting models, for Yars^{E196K/E196K}; tRNA^{Tyr/+} and Yars^{E196K/+}; tRNA^{Tyr/+} mice the following parameters will be studied: body weight, inverted grid test, 4-paw grip strength and CatWalk to evaluate motor performance, and electromyography (EMG) to evaluate nerve conduction velocity (NCV) and compound muscle action potential (CMAP). These assays will be performed at 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 months for Yars^{E196K/E196K}; tRNA^{Tyr/+} mice and littermate controls and 4, 6, 8, 10, 12 and 14 months for Yars^{E196K/+}; tRNA^{Tyr/+} mice and littermate controls. Histopathology and molecular analysis of the tissue will be performed after the last assay (8 months for Yars^{E196K/E196K}; tRNA^{Tyr} mice and littermate controls and 14 months for Yars^{E196K/+}; tRNA^{Tyr/+} mice and littermate controls) and additional time points with separate cohorts (4, 5, 6 and 7 months for Yars^{E196K/E196K}; tRNA^{Tyr/+} mice and littermate controls and 8, 10 and 12 months of age for Yars^{E196K/+}; tRNA^{Tyr/+} mice and littermate controls). Histopathology will include axon number and diameter in motor and sensory branches of the femoral nerve and NMJ innervation status in distal muscles (animal procedure/experiment 13 in the DAP, see also Table 1). Evaluating the mice at these time points gives us the chance to compare pre-symptomatic stages with the initial symptomatic stage (4 months for Yars^{E196K/E196K} mice; 8, months Yars^{E196K/+} mice) and with late symptomatic stages.

In case the FUNCAT experiments in aim 1 reveal inhibition of protein synthesis in CMT-TyrRS mice, we will evaluate by FUNCAT whether the protein synthesis defect is rescued by tRNA^{Tyr/+} overexpression (animal procedure/experiment 5 in the DAP, see also Table 1).

Aim 4. To evaluate the therapeutic potential of **10.1 c en 10.2 g** levels in a CMT-GlyRS mouse model, we will:

i) **10.1 c en 10.2 g**

we will first evaluate whether this approach allows for **10.1 c en 10.2 g** to motor neurons in wildtype mice. To this end, **10.1 c en 10.2 g** will be administered via intracerebroventricular (i.c.v.) injection in

wildtype mice and the target localization and amount of expression will be revealed by immunostaining of brain and spinal cord sections (animal procedure/experiment 14 in the DAP, see also Table 1). If sufficient 10.1 c en 10.2 g is not confirmed in motor neurons, the subsequent experiments (animal procedure/experiment 15, 16 and 6 in the DAP, see also Table 1) will not be performed.

If sufficient 10.1 c en 10.2 g is confirmed, 10.1 c en 10.2 g with the best outcome will be delivered in wildtype mice by use of a needle implanted in the lateral ventricle, connected via a catheter to a subcutaneously implanted Alzet osmotic pump. Immunostaining will be performed to evaluate the efficiency of 10.1 c en 10.2 g via catheter connected to an osmotic pump (animal procedure/experiment 15 in the DAP, see also Table 1). If sufficient 10.1 c en 10.2 g is not confirmed, we may consider the use of other types of Alzet pumps such as 1007D or i.c.v. injection.

Subsequently, 10.1 c en 10.2 g will be continuously administered in Gars^{C201R/+} mice and littermate controls via a needle implanted in the lateral ventricle, connected via a catheter to a subcutaneously implanted Alzet osmotic pump over the course of 4 weeks, and change in neuropathy phenotypes will be monitored along with FUNCAT analysis (animal procedure/experiment 16 and 6 in the DAP, see also Table 1).

ii) test the therapeutic effect of the adeno-associated viral (AAV) vector AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC}, encoding tRNA^{Gly-GCC}, administration in Gars^{C201R/+} mice and littermate controls. AAV vectors have previously been used for treatment strategies in neurological disease. Therefore, unlike 10.1 c en 10.2 g, the concept of 10.1 c en 10.2 g doesn't have to be proven. In an initial experiment, we will treat neonatal Gars^{C201R/+} mice and littermate controls (P0) and compare two administration routes: intracerebroventricular (i.c.v.) and intravenous (i.v.). In neonatal mice, i.v.-delivered AAV9 can cross the blood-brain barrier and reach the dorsal root ganglia and motor neurons throughout the spinal cord [14, 15, 16]. I.c.v. delivery of AAV9 results in even more efficient transduction of motor and sensory neurons [17, 19]. However, i.v. delivery also transduces peripheral tissues, including muscle [18, 20 - 22].

To evaluate whether AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} induces therapeutic effects the peripheral neuropathy phenotype will be monitored along with FUNCAT analysis (animal procedure/experiment 17 and 7 in the DAP, see also Table 1). In case a substantial therapeutic effect is found, a separate cohort of mice will be followed-up longitudinally to determine how long the therapeutic effect lasts (animal procedure/experiment 18 in the DAP, see also Table 1).

If the peripheral neuropathy is rescued by AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} injection in P0 mice, the same viral vector will be injected in 4 weeks old Gars^{C201R/+} mice and littermate controls. Mice will be again tested for peripheral neuropathy phenotypes along with FUNCAT analysis (animal procedure/experiment 19 and 8 in the DAP, see also Table 1). A separate cohort of mice will be followed-up in a long-term study (animal procedure/experiment 20 in the DAP, see also Table 1).

Usage of heterozygous and homozygous mice:

The heterozygous Gars^{C201R/+} mouse model already has a strong CMT phenotype with early symptomatic onset. Homozygous Gars^{C201R/C201R} die by postnatal day 17 and show gait disturbance and other neurological impairments [23]. Accordingly, breeding homozygous Gars^{C201R/C201R} would cause unjustified and for the desired readout unnecessary discomfort.

Both the heterozygous Yars^{E196K/+} and the homozygote Yars^{E196K/E196K} mouse models show a mild phenotype with relatively late onset (8 months and 4 months, respectively). We would like to study whether both Yars^{E196K/+} and Yars^{E196K/E196K} can be rescued by tRNA^{Tyr} overexpression.

As Yars^{E196K/E196K} mice show more pronounced peripheral neuropathy phenotypes, rescuing these phenotypes by tRNA^{Tyr} overexpression would be biologically more significant. However, as CMT-TyrRS patients are heterozygous for YARS mutations, Yars^{E196K/+} mice exactly recapitulate the genetic situation in patients. Therefore, we will use both Yars^{E196K/+} and Yars^{E196K/E196K} mice in our experiments. An additional reason is that this will allow us to determine whether one copy of wildtype TyrRS is required for rescue of peripheral neuropathy by tRNA^{Tyr} overexpression.

Accordingly, for experiments involving Gars^{C201R} mice, we only will use only heterozygote mice (Experiment 6-8 and 16-20), while for experiments

involving Yars^{E196K} mice, we will use heterozygote and homozygote mice (Experiment 1-5; 9 and 11-13). Ribosome experiments 11 and 12 will only be performed with the genotypes that also show an effect in FUNCAT and motor performance experiments 1 and 2, or 13.

References:

1. Erdmann I, Marter K, Kobler O, Niehues S, et al. 2015. Cell-selective labelling of proteomes in *Drosophila melanogaster*. Nature communications 6: 7521.
2. Niehues S, Bussmann J, Steffes G, Erdmann I, et al. 2015. Impaired protein translation in *Drosophila* models for Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mutant tRNA synthetases. Nature communications 6: 7520.
3. Alvarez-Castelao B, Schanzenbacher CT, Hanus C, Glock C, et al. 2017. Cell-type-specific metabolic labeling of nascent proteomes in vivo. Nat Biotechnol 35: 1196-201.
4. Rossi J, Balthasar N, Olson D, Scott M, et al. 2011. Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. Cell metabolism 13: 195-204.
5. Rotolo T, Smallwood PM, Williams J, Nathans J. 2008. Genetically-directed, cell type-specific sparse labeling for the analysis of neuronal morphology. PLoS One 3: e4099.
6. Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, et al. 1996. Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. Cell 87: 1317-26.
7. Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, et al. 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. Nat Neurosci 7: 1233-41.
8. Gregorian C, Nakashima J, Le Belle J, Ohab J, et al. 2009. Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis. J Neurosci 29: 1874-86.
9. Udagawa T, Farny NG, Jakovcevski M, Kaphzan H, et al. 2013. Genetic and acute CPEB1 depletion ameliorate fragile X pathophysiology. Nat Med 19: 1473-7.
10. Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, et al. 2011. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. Cell 146: 247-61.
11. Sanz E, Yang L, Su T, Morris DR, et al. 2009. Cell-type-specific isolation of ribosome-associated mRNA from complex tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 13939-44.
12. Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS. 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. Science 324: 218-23.
13. Ishimura R, Nagy G, Dotu I, Zhou H, et al. 2014. RNA function. Ribosome stalling induced by mutation of a CNS-specific tRNA causes neurodegeneration. Science 345: 455-9.
14. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, et al. 2009. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. Nat Biotechnol. 27(1):59-65.
15. Foust KD, Salazar DL, Likhite S, Ferraiuolo L, et al. 2013. Therapeutic AAV9-mediated suppression of mutant SOD1 slows disease progression and extends survival in models of inherited ALS. Mol Ther. 21(12):2148-59.
16. Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, et al. 2010. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. Nat Biotechnol. 28(3):271-4.
17. Meyer K, Ferraiuolo L, Schmelzer L, Braun L, et al. 2015. Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: a dose-response study in mice and nonhuman primates. Mol Ther. 23(3):477-87.
18. Powis RA, Karyka E, Boyd P, Come J, et al. 2016. Systemic restoration of UBA1 ameliorates disease in spinal muscular atrophy. JCI Insight. 1(11): e87908.

19. McLean JR, Smith GA, Rocha EM, Hayes MA, et al. 2014. Widespread neuron-specific transgene expression in brain and spinal cord following synapsin promoter-driven AAV9 neonatal intracerebroventricular injection. *Neurosci Lett.* 576: 73-8.
20. Fu H, Dirosario J, Killedar S, Zaraspe K, et al. 2011. Correction of neurological disease of mucopolysaccharidosis IIIB in adult mice by rAAV9 trans-blood-brain barrier gene delivery. *Mol Ther.* 19(6):1025-33.
21. Gray SJ, Matagne V, Bachaboina L, Yadav S, et al. 2011. Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol Ther.* 19(6):1058-69.
22. Dufour BD, Smith CA, Clark RL, Walker TR, et al. 2014. Intrajugular vein delivery of AAV9-RNAi prevents neuropathological changes and weight loss in Huntington's disease mice. *Mol Ther.* 22(4):797-810.
23. Achilli F, Bros-Facer V, Williams HP, Banks GT, et al. 2009. An ENU-induced mutation in mouse glycyl-tRNA synthetase (GARS) causes peripheral sensory and motor phenotypes creating a model of Charcot-Marie-Tooth type 2D peripheral neuropathy. *Dis Model Mech* 2: 359-73.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

FUNCAT

Aim 1, 3 and 4 of the project all involve fluorescent non-canonical amino acid tagging (FUNCAT). FUNCAT involves the administration of the non-canonical amino acid azidonorleucine (ANL) to mice that express a modified MetRS* transgene in the cell type of interest. For FUNCAT in mice, we have already optimized an administration procedure in our previous lab at the Max Planck Institute for Molecular Biomedicine in Münster (Germany), which results in very distinct labeling of NSPs in motor neurons. A dose of 400mg/kg ANL is intraperitoneally (i.p.) injected. Eight hours later, the mouse is anesthetized, and when the anesthesia is deep enough, the thorax of the mice is surgically opened and the mice are transcardially perfused, followed by dissection of brain, spinal cord and/or dorsal root ganglia and further processing for fluorescent labeling of NSPs.

Aim 1 of this proposal involves FUNCAT in motor neurons (experiment 1 in the DAP, see also Table 1), in sensory neurons (experiment 2 in the DAP, see also Table 1), glutamatergic excitatory neurons (experiment 3 in the DAP, see also Table 1) and astrocytes (experiment 4 in the DAP, see also Table 1).

For FUNCAT labeling of NSPs in sensory neurons, similar experimental groups (genotypes) will be used as for FUNCAT in motor neurons, but replacing the ChAT^{cre} transgene by NFL^{creER}. In this case, the cre transgene needs to be induced by tamoxifen injection. As we wish to sparsely label large myelinated sensory neurons, to facilitate the identification of individual labeled sensory neurons in the dorsal root ganglia (DRG), we will use a single i.p. injection of a low dose of 4-hydroxytamoxifen (0,05 – 0,4 mg/mouse) in the time frame of postnatal day 1 to 10. This procedure has been successfully used for sparse labeling of retinal ganglion cells using the NFL^{creER} mice [1] (experiment 2 in the DAP, see also Table 1).

Experiment 3 and 4 of this proposal involves FUNCAT labeling of NSPs. Similar experimental groups (genotypes) as for FUNCAT in motor neurons will be used, but replacing the ChAT-cre transgene by Camk2 α -cre [2] and GFAP-cre [3, 4], respectively (experiment 3 and 4 in the DAP, see also Table 1).

eIF2 α phosphorylation levels

In aim 2 of the proposal, we wish to evaluate whether eIF2 α phosphorylation levels are altered in the spinal cord and dorsal root ganglia of Yars^{E196K/E196K} mice at 4 months of age and Yars^{E196K/+} mice at 8 months of age. For these experiments, western blotting and immunohistochemistry (experiments 9.1 and 9.2 in the DAP, see also Table 1) will be performed using the selected antibodies. For these procedures, mice will be deeply

anesthetized, followed by decapitation, rapid dissection of brain, spinal cord, and DRGs and snap freezing in liquid nitrogen for storage at -80°C or immediate extraction of proteins.

Ribosome transit rate

As part of aim 3, we will determine whether translation elongation is affected in CMT-TyrRS mice and whether this potential effect can be rescued by tRNA^{Tyr/+} overexpression, by monitoring the ribosome transit rate in spinal cord extracts. Therefore, we will use an assay based on the run-off of ribosomes that are actively engaged in protein synthesis [5, 6] (experiment 11 in the DAP, see also Table 1). Yars^{E196K/E196K}; tRNA^{Tyr/+} and Yars^{E196K/+}; tRNA^{Tyr/+} mice and the respective littermate control mice will be deeply anesthetized, decapitated, and their spinal cords will be rapidly dissected and used for the ribosome transit rate assay, as described [5, 6].

Ribosome footprinting

For the ribosome footprinting experiment described in aim 3 (experiment 12 in the DAP, see also Table 1), we wish to detect ribosome stalling on Tyr codons of transcripts isolated from spinal motor neurons of CMT-TyrRS and control mice. These mice will be deeply anesthetized, decapitated, and spinal cords will be rapidly dissected, snap frozen in liquid nitrogen, and shipped to our collaborator Marina Chekulaeva (MDC for Molecular Medicine, Berlin, Germany). In order to obtain sufficient RNA for these experiments, we expect that spinal cords from five mice will have to be pooled to obtain one sample.

Northern blotting

The same animal procedure will be used for the Northern blotting experiments to quantify the level of tRNA^{Tyr/+} overexpression (experiment 10 in the DAP, see also Table 1): mice will be deeply anesthetized, decapitated, and spinal cords, brains, peripheral nerves and muscles will be rapidly dissected and snap frozen in liquid nitrogen for storage at 80°C and later processing for tRNA northern blotting. For these experiments, tRNA^{Tyr-high/+} (high copy number of tRNA^{Tyr}) mice and tRNA^{Tyr-low/+} (low copy number of tRNA^{Tyr}) mice and their wildtype littermate controls will be used.

Motor performance and EMG

To evaluate the effect of tRNA^{Tyr/+} overexpression on the peripheral neuropathy phenotypes of homozygous Yars^{E196K/E196K} mice and heterozygous Yars^{E196K/+} mice (experiment 13 in the DAP, see also Table 1), we will cross Yars^{E196K/E196K} and Yars^{E196K/+} mice respectively to tRNA^{Tyr-high/+} (high copy number of tRNA^{Tyr}) mice and tRNA^{Tyr-low/+} (low copy number of tRNA^{Tyr}) mice. Yars^{E196K/E196K}; tRNA^{Tyr/+} mice and littermate controls will be monitored from 2 months of age (before symptomatic stage) onwards until the age of 8 months and we will monthly determine the body weight of the mice, followed by motor performance tests, and electromyographical (EMG) examination. For heterozygous Yars^{E196K/+}; tRNA^{Tyr/+} mice and littermate controls we will perform the same experiments every other month from 4 months of age (before symptomatic stage) onwards until the age of 14 months.

Motor performance

The motor capacities will be evaluated by the four limbs hang test. This test uses a wire grid system to non-invasively measure the ability of mice to use sustained limb tension to oppose gravitational force. The mice are placed on the wire grid, allowed to accommodate to this environment for 3-5 seconds, before gently inverting the grid, holding it at a height of approximately 35 cm over a mouse cage containing 5-6 cm of bedding. The wire grid hanging time is defined as the time that the mouse can hold on before falling from the inverted grid. For each mouse, this procedure is repeated three times with approximately 10 minutes between each trial. If the mouse manages to hang for 1 minute, the grid is inverted again to terminate the trial, and the mouse receives the maximum hanging time of 60 seconds.

Afterwards, the 4-paw grip strength test will be performed. During the test, mice are placed on a grid connected to a dynamometer (Bioseb) and gently pulled off by their tail to measure the maximal peak force applied by the mouse on the grid. The measurement is repeated three times. Finally, the CatWalk test will be performed to automatically assess gait and locomotion. The mouse is placed on a 130cm glass plate corridor that guides the movement into a straight line towards a goal box. The footprints are captured from beneath to measure the parameters stride length, swing speed, body speed and body speed variation. For each mouse, this procedure is repeated three times. We have documented experience with performing these tests [7] ([experiment 13](#) in the DAP, see also Table 1).

EMG

After performing the four limbs hang test, the mice will undergo EMG examination as described above. For EMG, mice will be anesthetized by i.p. injection of a mixture of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (100mg/kg). When the anesthesia is deep enough, three "grounding" needle electrodes will be inserted subcutaneously in the back of the mice, at the base of the tail and in the Achilles tendon. The nerve conduction velocity (NCV, defined as the latency time between the electrical stimulus and the appearance of the muscle response) of the sciatic nerve and the compound muscle action potential (CMAP, will be reduced in case of axonal loss) will be determined. For this examination, a stimulation electrode (monopolar needle electrode) will be inserted subcutaneously at the sciatic notch level to stimulate the sciatic nerve. A recording electrode will be inserted in the gastrocnemius muscle to record amplitudes of muscle-evoked responses. This examination will be done for both the left and right gastrocnemius muscle, and the obtained NCV and CMAP values will be averaged. The mice are subsequently allowed to recover from anesthesia and returned to their home cage. We have longstanding experience with EMG analysis in mice, as shown by references [7, 8] ([experiment 13](#) in the DAP, see also Table 1).

Histology and molecular analysis

After the last EMG analysis (at 8 months of age for homozygous Yars^{E196K/E196K}; tRNA^{Tyr/+} mice and at 14 months of age for heterozygous Yars^{E196K/+}; tRNA^{Tyr/+} mice and the respective littermate controls), the depth of anesthesia will be double-checked, and the mice will be decapitated as described above, followed by dissection of spinal cord, femoral and sciatic nerves, and muscles for histological analysis.

Additional tissue dissections for western blotting and immunohistochemistry of homozygous Yars^{E196K/E196K}; tRNA^{Tyr/+} mice and heterozygous Yars^{E196K/+}; tRNA^{Tyr/+} mice and their respective littermate controls will be performed according to previously describe procedures (see [experiments 9.1 and 9.2](#) in the DAP) at several time points (4, 5, 6, 7 and 8 months for Yars^{E196K/E196K}; tRNA^{Tyr/+} mice and littermate controls and 8, 10, 12 and 14 months of age for Yars^{E196K/+}; tRNA^{Tyr/+} mice and littermate controls) from different cohorts ([experiment 13](#) in the DAP, see also Table 1).

In case the FUNCAT experiments in aim 1 reveal inhibition of protein synthesis in CMT-TyrRS mice, we will evaluate by FUNCAT whether the protein synthesis defect is rescued by tRNA^{Tyr/+} overexpression ([experiment 5](#) in the DAP, see also Table 1). The same FUNCAT procedure as described above will be used.

Therapeutic approach

10.1 c en 10.2 g

To evaluate the therapeutic potential of direct 10.1 c en 10.2 g, we will test a 10.1 c en 10.2 g in Aim 4. The goal is to administer 10.1 c en 10.2 g. We will administer 10.1 c en 10.2 g intracerebroventricularly (i.c.v.) to circumvent the blood-brain barrier and the blood-spinal cord barrier. First, we will proof the concept of 10.1 c en 10.2 g in motor neurons by i.c.v. injection of 10.1 c en 10.2 g in 4 different 10.1 c en 10.2 g in deeply anesthetized four weeks old wildtype mice. For i.c.v. injections, mice will be mounted in a stereotaxic apparatus and an incision in the skin covering the skull will be made. After drilling a hole in the skull a needle is inserted and 10.1 c en 10.2 g is slowly injected into the lateral ventricle. Finally the needle will be removed,

the skull is cemented and the skin sutured. After the surgery, mice will receive analgesia to avoid pain. After 48 hours the mice will be anesthetized, and when the anesthesia is deep enough, the mice are transcardially perfused as described above for further processing for fluorescence labeling of **10.1 c en 10.2 g** and ChAT (label for motor neuron; experiment 14 in the DAP, see also Table 1).

If sufficient **10.1 c en 10.2 g** can be detected in motor neurons, the **10.1 c en 10.2 g** via a catheter implanted in the lateral ventricle, connected to a subcutaneously implanted Alzet osmotic pump is evaluated in wildtype mice. To this end, mice will be anesthetized by continuous isoflurane inhalation. The surgery will be performed in four weeks old wildtype mice once the anesthesia is deep enough. Stereotactic surgery will be performed as described above with the following deviations: After positioning the needle in the lateral ventricle, it will be cemented and connected to an osmotic pump, which will be implanted subcutaneously. After the surgery, mice will receive analgesia to avoid pain. After 48 and 96 hours, the mice will be anesthetized by i.p. injection of a mixture of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (100mg/kg) and transcardially perfused as described above to evaluate the efficiency of **10.1 c en 10.2 g** by the previously described immunostaining of **10.1 c en 10.2 g** and ChAT. If **10.1 c en 10.2 g** in ChAT positive cells is not sufficient, other types of Alzet pumps such as 1007D or i.c.v. injection will be evaluated in wildtype mice, followed by above described perfusion and immunostaining (experiment 15 in the DAP, see also Table 1).

Once the most efficient administration is selected, **10.1 c en 10.2 g** will be continuously administered in Gars^{C201R/+} mice and littermate controls either by use of catheter implanted in the lateral ventricle, connected to a subcutaneously implanted Alzet osmotic pump or by above mentioned alternatives, starting from 4 weeks of age until the age of 8 weeks. For the implantation of the delivery system, mice will be anesthetized by continuous isoflurane inhalation and mice will receive analgesia to avoid pain after surgery. The peripheral neuropathy will be monitored weekly from 3 weeks until 8 weeks of age, including body weight, followed by motor performance tests, and electromyographical (EMG) examination, as described above. After the last EMG analysis, the mice will be decapitated, followed by dissection of spinal cord, femoral and sciatic nerves, and muscles for histological and molecular analysis (experiment 16 in the DAP, see also Table 1).

In case these experiments reveal a rescue of the peripheral neuropathy phenotype of CMT-GlyRS mice by **10.1 c en 10.2 g**, we will evaluate by FUNCAT whether the protein synthesis defect is rescued as well. The same FUNCAT procedure as described above will be used (experiment 6 in the DAP, see also Table 1).

AAV9-mediated gene transfer for tRNA^{Gly-GCC} overexpression

Furthermore, we will evaluate whether AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} induces therapeutic effects as compared to control (AAV9-GFP) in Aim 4. AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} will be produced by our collaborator Dr. Scott Harper.

In the first experiment, we will inject AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} or AAV9-GFP i.c.v. or i.v. in neonatal (P0) Gars^{C201R/+} mice and littermate controls. For i.c.v. and i.v. injections P0 pups will be anesthetized via cryoanesthesia. The P0 pups will be rested on a bed of ice and when the anesthesia is deep enough the injection procedure will be performed. For both procedures a Hamilton syringe and a 32-gauge needle will be used. For injection in to the lateral ventricles, the needle will be positioned lateral to the sagittal suture and rostral to the neonatal coronal suture and introduced. For i.v. injections, the needle will be introduced into the superficial temporal vein in a caudal orientation. This experiment allows us to compare two administration routes (i.c.v. and i.v.) and to test for a therapeutic effect. We will weekly monitor body weight and motor performance (inverted grid test, 4-paw grip strength, CatWalk) from 3 weeks of age onward and perform EMG analysis as described above at 4, 8 and 12 weeks of age. After the last EMG analysis the depth of anesthesia will be double-checked, and the mice will be decapitated as described above. Spinal cord, femoral and sciatic nerves, and muscles will be harvested for molecular and histological analysis (experiment 17 in the DAP, see also Table 1).

If a therapeutic effect is found in this first experiment, a second cohort of mice will be followed-up longitudinally to determine how long the therapeutic effect lasts (experiment 18 in the DAP, see also Table 1). In that case, we also will evaluate by FUNCAT whether the protein synthesis defect is rescued. The same FUNCAT procedure as described above will be used (experiment 7 in the DAP, see also Table 1).

If these initial experiments reveal a therapeutic effect induced by AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC}, follow-up experiments will involve AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} administration to 4-week-old mice. The administration route depends on the outcome of the previous experiments. In case i.c.v. delivery resulted in

equal or superior therapeutic effects as compared to i.v. delivery, i.c.v. delivery will also be used at here. In case the initial experiments show that i.v. delivery induces more profound therapeutic effects, we will perform i.c.v. and i.v. co-administration in 4-week-old mice, as blood-brain-barrier permeability for AAV9 becomes more limited in older mice [9, 10]. For injections, mice will be anesthetized by continuous isoflurane inhalation. Injections will be performed once the anesthesia is deep enough. For i.c.v. injection, stereotaxis will be used as described above. For i.v. injections, the animal will be warmed to dilate the veins and the needle will be introduced in the lateral tail vein. The injection volume depends on the bodyweight of the animal.

Behavioral, EMG and neuropathological follow-up will be as described for the initial experiment (experiment 19 in the DAP, see also Table 1), and a cohort of mice will be followed-up longitudinally to determine how long an eventual therapeutic effect lasts (experiment 20 in the DAP, see also Table 1).

Mouse line generation

The planned experiments require the generation of a Yars^{E196K} (Yars^{E196K/+} and Yars^{E196K/E196K}) mouse line (10.1 c en 10.2 g) and of tRNA^{Tyr-high/+} and tRNA^{Tyr-low/+} (generation in collaboration with Taconic Biosciences GmbH). The expected discomfort of Yars^{E196K/+} and Yars^{E196K/E196K} mice is maximum mild and for tRNA^{Tyr-high/+} and tRNA^{Tyr-low/+} mice we do not expect any discomfort. We expect that crossing both lines ameliorate the phenotype of Yars^{E196K/+} and Yars^{E196K/E196K} mice. The phenotype of all lines will again be assessed together with the animal welfare body, once the mice arrive in our animal facility.

References:

1. Rotolo T, Smallwood PM, Williams J, Nathans J. 2008. Genetically-directed, cell type-specific sparse labeling for the analysis of neuronal morphology. PLoS One 3: e4099.
2. Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, et al. 1996. Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. Cell 87: 1317-26.
3. Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, et al. 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. Nat Neurosci 7: 1233-41.
4. Gregorian C, Nakashima J, Le Belle J, Ohab J, et al. 2009. Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis. J Neurosci 29: 1874-86.
5. Udagawa T, Farny NG, Jakovcevski M, Kaphzan H, et al. 2013. Genetic and acute CPEB1 depletion ameliorate fragile X pathophysiology. Nat Med 19: 1473-7.
6. Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, et al. 2011. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. Cell 146: 247-61.
7. Scekcic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, et al. 2017. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol.
8. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, et al. 2001. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. Nat Genet 28: 131-8.
9. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, et al. 2009. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. Nat Biotechnol. 27(1):59-65.
10. Gadalla KK, Bailey ME, Spike RC, Ross PD, et al. 2013. Improved survival and reduced phenotypic severity following AAV9/MECP2 gene transfer to neonatal and juvenile male Mecp2 knockout mice. Mol Ther. 21(1):18-30.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project.

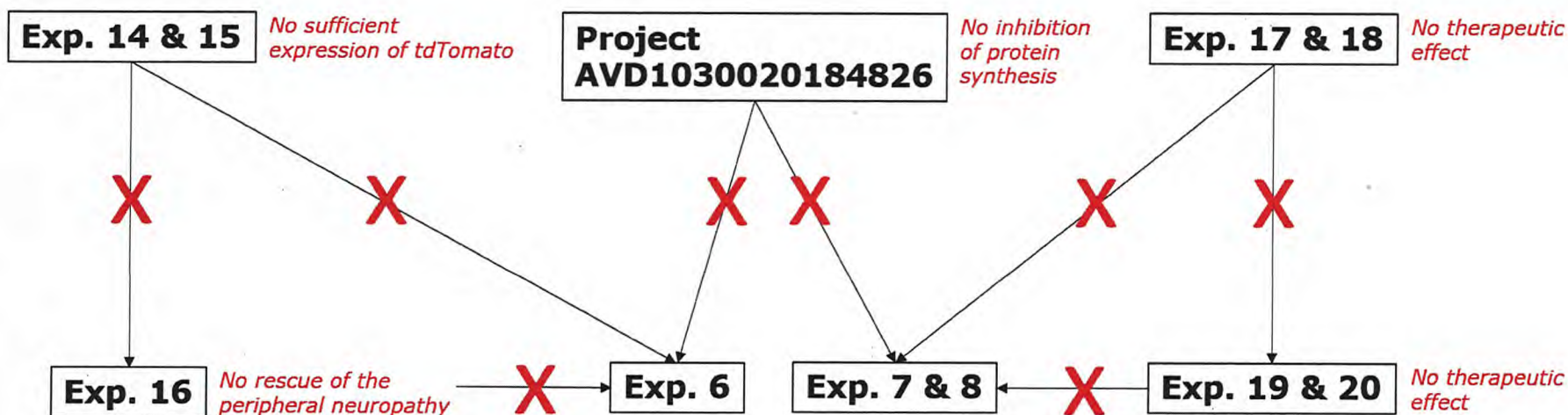
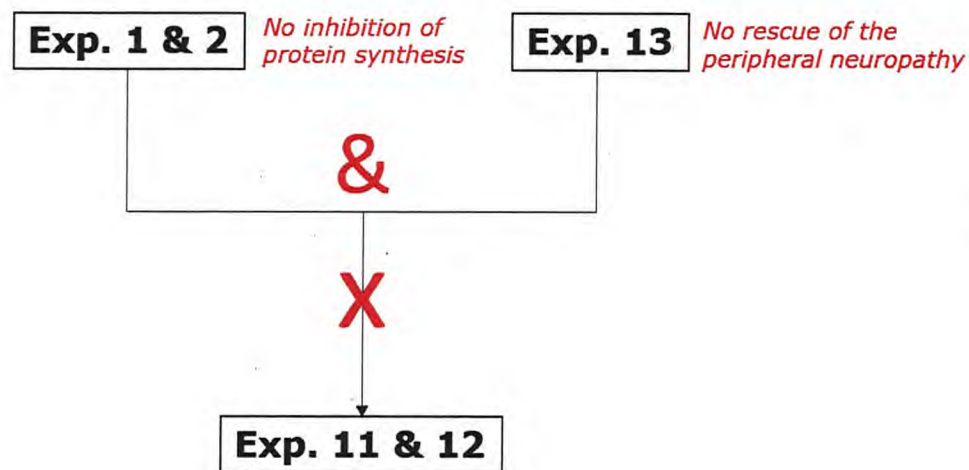
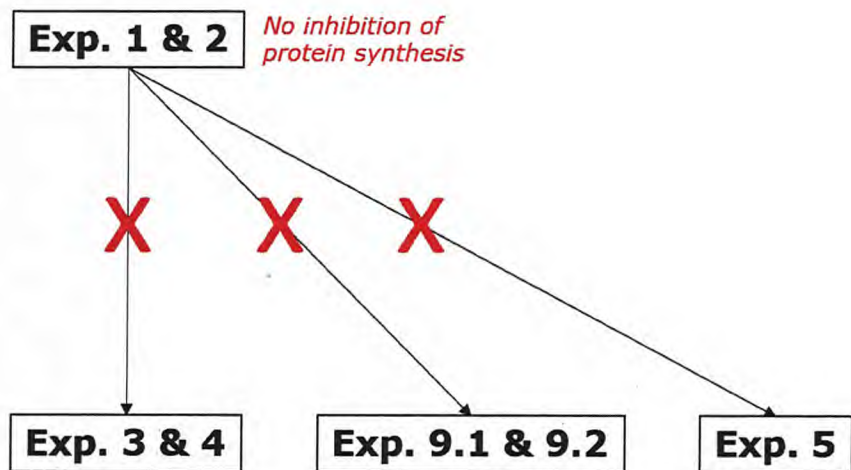
If applicable, describe the milestones and selection points

All of the experiments have the overarching goal of rescuing peripheral neuropathy of mouse models for CMT peripheral neuropathy caused by mutations in tyrosine and glycyl-tRNA synthetase by cognate tRNA overexpression or **10.1 c en 10.2 g**. This way, all of the four specific aims are interconnected.

Some of the experiments described in this proposal will only be performed depending on the outcome of other experiments. These include:

1. If the FUNCAT in motor and/or sensory neurons of the CMT-TyrRS mouse model does not reveal inhibition of protein synthesis (Aim 1, Experiments 1 and 2)
 - a. FUNCAT in glutamatergic excitatory neurons and astrocytes will not be performed (Aim 1, Experiments 3 and 4).
 - b. eIF2 α phosphorylation levels in the spinal cord and dorsal root ganglia of Yars^{E196K/E196K} and Yars^{E196K/+} mice will not be studied (Aim 2 + 3, Experiments 9.1 and 9.2).
 - c. FUNCAT experiments to evaluate whether tRNA^{Tyr/+} overexpression rescues protein synthesis defects in motor and sensory neurons of CMT-TyrRS mouse models will not be performed (Aim 3, Experiment 5).
2. If the FUNCAT in motor and/or sensory neurons of the CMT-GlyRS mouse model does not reveal inhibition of protein synthesis (Project AVD1030020184826)
 - a. FUNCAT experiments to evaluate whether the protein synthesis defect is rescued in CMT-GlyRS mice by **10.1 c en 10.2 g** will not be performed (Aim 4, Experiment 6).
 - b. FUNCAT experiments to evaluate whether the protein synthesis defect is rescued in CMT-GlyRS mice by AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} administration to P0 mice will not be performed (Aim 4, Experiment 7).
 - c. FUNCAT experiments to evaluate whether the protein synthesis defect is rescued in CMT-GlyRS mice by AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} administration to 4-week-old mice will not be performed (Aim 4, Experiment 8).
3. If sufficient expression of **10.1 c en 10.2 g** can not be detected in motor neurons by immunohistochemistry (Aim 4, Experiments 14 and 15)
 - a. **10.1 c en 10.2 g** will not be delivered to Gars^{C201R/+} mice, and motor performance and EMG experiments **10.2 e. en g** Gars^{C201R/+} mice will not be performed (Aim 4, Experiment 16).
 - b. FUNCAT experiments to evaluate whether the protein synthesis defect is rescued in CMT-GlyRS mice by **10.1 c en 10.2 g** will not be performed (Aim 4, Experiment 6).
4. If motor performance and EMG experiments do not reveal a rescue of the peripheral neuropathy phenotype of CMT-GlyRS mice by **10.1 c en 10.2 g** (Aim 4, Experiment 16)
 - a. FUNCAT experiments to evaluate whether the protein synthesis defect is rescued in CMT-GlyRS mice by **10.1 c en 10.2 g** will not be performed (Aim 4, Experiment 6).
5. If a therapeutic effect in Gars^{C201R/+} mice can not be found after administration of AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} at P0 (Aim 4, Experiment 17 and 18)
 - a. FUNCAT experiments to evaluate whether the protein synthesis defect is rescued in CMT-GlyRS mice by AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} administration to P0 mice will not be performed (Aim 4, Experiment 7).
 - b. AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} will not be injected in 4 weeks old Gars^{C201R/+} mice, and monitoring motor performance and EMG experiments will not be performed (Aim 4, Experiment 19 and 20).
 - c. FUNCAT experiments to evaluate whether the protein synthesis defect is rescued in CMT-GlyRS mice by AAV9-U6-tRNA^{Gly-GCC} administration to 4-week-old mice will not be performed (Aim 4, Experiment 8).
6. (i) If the FUNCAT experiments do not show changes in protein synthesis in CMT-TyrRS mice (Aim 1, Experiment 1 and 2), **AND**

- (ii) If tRNA-Tyr overexpression does not rescue peripheral neuropathy phenotypes of CMT-TyrRS mice (Aim 3, Experiment 13),
- a. Ribosome transit rate experiment to evaluate the translation elongation rate (Aim 3, Experiment 11) and ribosome footprinting experiment to evaluate whether the ribosome stalls on tyrosine codons (Aim 3, Experiment 12) will not be performed (heterozygous Yars^{E196K/+} and the homozygote Yars^{E196K/E196K} will be evaluated independently)



The 'X' indicates a cancellation of the respective follow-up experiment.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Rescue of CMT-aaRS mouse models by overexpression of cognate tRNA

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1030020209867 / 2020-0012
2. Titel van het project: Rescue of CMT-aaRS mouse models by overexpression of cognate tRNA
3. Titel van de NTS: Genezing van neuropathie in muis modellen door toediening van tRNA
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 08-05-2020
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 12-05-2020
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 18-05-2020 tot 16-06-2020
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 16-06-2020
 - advies aan CCD: 30-06-2020
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 18-05-2020
 - Datum antwoorden: 16-06-2020
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-3.2: Aim2 is nog niet ingeleid bij 3.1. Het belang van dit subdoel is daardoor slecht in te schatten.

Antwoord: Text is added in 3.1 for a better understanding of aim 2.

-3.4: Er worden twee nieuwe muizenlijnen gemaakt. Verwacht u dat het een fok met ongerief zou kunnen zijn? Graag toelichten.

Antwoord: The planned experiments require the generation of a YarsE196K (YarsE196K/+ and YarsE196K/E196K) mouse line (10.1 c en 10.2 g [redacted] and of tRNATyr-high/+ and tRNATyr-low/+ (generation in collaboration with Taconic Biosciences GmbH). The expected discomfort of YarsE196K/+ and YarsE196K/E196K mice is maximum mild and for tRNATyr-high/+ and tRNATyr-low/+ mice we do not expect any discomfort. We expect that crossing both lines ameliorate the phenotype of YarsE196K/+ and

YarsE196K/E196K mice. The phenotype of all lines will again be assessed together with the animal welfare body, once the mice arrive in our animal facility.

-3.4.1: U zult soms homozygote CMT-TyrRS dieren gebruiken en soms heterozygoten. Kunt u duidelijker uitleggen wanneer u welke dieren gebruikt en wat de rationale daarachter is?

Antwoord: To clarify the usage of homozygote and heterozygote, we added the following information to section 3.4.1:

The heterozygous GarsC201R/+ mouse model already has a strong CMT phenotype with early symptomatic onset. Homozygous GarsC201R/C201R die by postnatal day 17 and show gait disturbance and other neurological impairments [1]. Accordingly, breeding homozygous GarsC201R/C201R would cause unjustified and for the desired readout unnecessary discomfort.

Both the heterozygous YarsE196K/+ and the homozygote YarsE196K/E196K mouse models show a mild phenotype with relatively late onset (8 months and 4 months, respectively). We would like to study whether both YarsE196K/+ and YarsE196K/E196K can be rescued by tRNATyr overexpression.

As YarsE196K/E196K mice show more pronounced peripheral neuropathy phenotypes, rescuing these phenotypes by tRNATyr overexpression would be biologically more significant. However, as CMT-TyrRS patients are heterozygous for YARS mutations, YarsE196K/+ mice exactly recapitulate the genetic situation in patients. Therefore, we will use both YarsE196K/+ and YarsE196K/E196K mice in our experiments. An additional reason is that this will allow us to determine whether one copy of wildtype TyrRS is required for rescue of peripheral neuropathy by tRNATyr overexpression.

Accordingly, for experiments involving GarsC201R mice, we only will use only heterozygote mice (Experiment 6-8 and 16- 20), while for experiments involving YarsE196K mice, we will use heterozygote and homozygote mice (Experiment 1-5; 9 and 11-13). Ribosome experiments 11 and 12 will only be performed with the genotypes that also show an effect in FUNCAT and motor performance experiments 1 and 2, or 13.

Reference:

1. Achilli F, Bros-Facer V, Williams HP, Banks GT, et al. 2009. An ENU-induced mutation in mouse glycyl-tRNA synthetase (GARS) causes peripheral sensory and motor phenotypes creating a model of Charcot-Marie-Tooth type 2D peripheral neuropathy. *Dis Model Mech* 2: 359-73.

-3.4.2: Wat is de resolutie van uw FUNCAT-techniek? Kunt u hier kwantitatieve bepalingen mee doen, en zo ja wat is de nauwkeurigheid daarvan?

Antwoord: It is possible to do quantitative measurements with FUNCAT. FUNCAT fluorescently labels the NSPs, and the amount of NSPs is proportional to the fluorescence intensities within single cells, which can be determined by fluorescent microscopy. The intensity per cell can be quantified. An illustration showing NSPs (including quantification) in GarsC201R/+ animals is added.

-3.4.3: De commissie waardeert uw beschrijving van de onderlinge samenhang en afhankelijkheid. Zij vraagt zich echter af of alle go / no go momenten zijn aangegeven. De commissie mist experimenten 10-13 in uw figuur. Is het bijvoorbeeld zinvol om experimenten 10-13 uit te voeren indien u geen effect op eiwitsynthese heeft kunnen vaststellen in experiment 1&2?

Antwoord: Thank you for pointing this out. Since tRNAGly overexpression fully rescues peripheral neuropathy phenotypes of CMT-GlyRS mice, we believe that supplying cognate tRNAs to tRNA-synthetase mutants might be a common rescue mechanism. Therefore, it is crucial to study whether tRNATyr overexpression rescues peripheral neuropathy phenotypes of Yars mice (Aim 3, [Experiment 13](#)). Understanding whether our hypothesis is correct is an important step towards designing future therapeutic strategies. Therefore, Experiment 13 does not depend on the outcome of other experiments.

If tRNATyr overexpression would rescue the peripheral neuropathy phenotypes of CMT-TyrRS mice, the most likely target site is translation elongation, even if FUNCAT does not detect clear inhibition of global protein synthesis (the translation defect might be below the FUNCAT detection limit). Accordingly, experiments 11 and 12 will be performed in that case.

Experiment 10 does not depend on the outcome of other experiments, since it aims at characterising the newly generated tRNATyr overexpression mouse lines.

Consequently, the interdependence of experiments 10-13 is as follows:

- (i) If the FUNCAT experiments do not show changes in protein synthesis in CMT-TyrRS mice (Aim 1, [Experiment 1 and 2](#)), AND*
- (ii) If tRNA-Tyr overexpression does not rescue peripheral neuropathy phenotypes of CMT-TyrRS mice (Aim 3, [Experiment 13](#)), the ribosome transit rate (Aim 3, [Experiment 11](#)) and ribosome footprinting (Aim 3, [Experiment 12](#)) experiments will not be performed.*

Concerning this interdependency, heterozygous YarsE196K/+ and the homozygote YarsE196K/E196K will be evaluated independently.

Description of Animal Procedures:

***DAP1**

De tabel op pagina 26 is slecht leesbaar.

Antwoord: We increased resolution of all tables and figures within the DAP and hope the tables and illustrations are now easier to read.

-B: De onderbouwing voor de gemaakte keuzes (genetic background, life stage) ontbreekt. Kunt u duidelijker opschrijven wanneer u vrouwen kunt gebruiken?

Antwoord: We added the following information to section B:

Genetic background:

All transgenic mouse lines we use for the studies have a C57/Bl6 background. C57/Bl6 is a standard background for most research using mice. The benefit of having all our mice on the same background (inbred strain) is that it reduces the phenotypic variation between the animals. It is also the strain in which CMT2D phenotypes can be more easily observed [1] and will make our data comparable with what is available currently in literature.

Life stage:

*- Neonatal/Adolescent: we would like to examine from which time point in development **10.1 c en 10.2 g** is required to rescue the CMT phenotype of GarsC201R/+ mice.*

- Adult: From 8 weeks on, GarsC201R/+ mice are symptomatic and we want study the treated GarsC201R/+ mice and littermate controls in their symptomatic age. The age of symptom onset of YarsE196K/+ mice is 8 months and of YarsE196K/E196K mice 4 months. We would like to study both at their symptomatic age.

Gender of animals:

Only male animals will be used, since males have more muscular weight compared to females and display clearly different capacities in behavioural tests than female mice. Since we study progressive muscle atrophy, it is therefore crucial to our study to use mice from the same gender. As we have performed our previous experiments with males, and we know from initial experiments that the variation in behavioral parameters is more pronounced in females than in males, we will use males for our experiments, as this allows meaningful comparison to historical data. Additionally, females suffer from monthly hormonal fluctuations which might increase the variability of the data. Less variability allows to use less animals per experimental group.

We removed the following sentence:

Wherever possible, we will use female mice for experiments, as this reduces the killing of "surplus" animals.

Reference:

1. Achilli F, Bros-Facer V, Williams HP, Banks GT, et al. 2009. An ENU-induced mutation in mouse glycyl-tRNA synthetase (GARS) causes peripheral sensory and motor phenotypes creating a model of Charcot-Marie-Tooth type 2D peripheral neuropathy. *Dis Model Mech* 2: 359-73.

-K: Het ongerief van individuele huisvesting ontbreekt in de opsomming.

Antwoord: We added the missing information.

Niet-technische samenvatting:

- U wordt verzocht na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: We added the following sentence to section 3.4:

Dieren die een operatie ondergaan zullen individueel worden gehuisvest, dit kan ook stressvol zijn voor de dieren.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De ziekte van Charcot-Marie-Tooth (CMT) is een relatief vaak voorkomende neurodegeneratieve ziekte die leidt tot spierzwakte en verlies van gevoel in voeten en handen. Patiënten kunnen last hebben van hamertenen, klompvoeten en klauwhanden, tot spierzwakte in onderbenen en -armen die het dagelijks functioneren bemoeilijken. Heterozygote mutaties in genen die coderen voor cytoplasmatische aminoacyl tRNA synthetases (aaRSs) zijn aangetoond bij mensen met deze

ziekte. Deze basaal wetenschappelijke aanvraag richt zich op onderzoek naar de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij CMT veroorzaakt door mutaties in aaRSs. Door deze mutaties hapert de eiwitsynthese in motorische en sensorische zenuwcellen, zo is recent gebleken. Er is al veel onderzoek gedaan met behulp van diermodellen met gemuteerd glycyl-tRNA synthetase (GlyRS). Overexpressie van tRNA^{Gly} leidde tot opheffen van het eiwitsynthese defect in fruitvliegmodellen met mutant GlyRS, en tot herstel van het fenotype. De onderzoekers verwachten dat gemuteerde aaRSs na aminoacylatie de tRNAs slechts heel langzaam (of niet) loslaten waardoor er te weinig gekoppeld tRNA beschikbaar is voor eiwitsynthese in het ribosoom. De onderzoekers hebben al een vergunning om dierproeven te doen met een muismodel voor CMT-GlyRS, waarmee zij de bevindingen in fruitvliegen hebben kunnen herhalen. Met de huidige projectaanvraag willen zij het onderzoek uitbreiden met muismodellen voor CMT-TyrRS, en willen zij het effect van twee mogelijke therapeutische strategieën bij twee muismodellen voor CMT onderzoeken om daarmee hun hypothese over het achterliggende moleculaire mechanisme te kunnen bevestigen. De aanvragers zullen eiwitsynthese in motorische en sensorische zenuwcellen, de mate van fosforylering van een translatie initiatie factor (eIF2 α), aspecten van eiwitsynthese in ribosomen, en het effect van tRNA^{Tyr} overexpressie op celniveau onderzoeken bij het CMT-TyrRS muismodel. Tenslotte zullen zij het therapeutische effect in het CMT-GlyRS muismodel onderzoeken van het intracranieel toedienen (10.1 c en 10.2 g) en van het intracranieel of in de bloedbaan brengen van een adenovector die codeert voor t(10.1 c en 10.2 g). Daarbij wordt het perifere neuropathische fenotype getest en wordt de eiwitsynthese in motorische en sensorische zenuwcellen gemeten. De commissie constateert op grond daarvan dat deze aanvraag een concrete, goed afgebakende doelstelling heeft en getypeerd kan worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4b uit de 'Handreiking invulling definitie project'. Er zijn meerdere subdoelen gedefinieerd die met behulp van goed omschreven experimenten zullen worden onderzocht. Het is niet mogelijk om de individuele subdoelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid en zij tezamen een geïntegreerd begrip van de moleculaire mechanismen in CMT-aaRS geven. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De commissie wil hierbij opmerken dat zij van mening is dat een aantal experimenten een translationeel doel hebben, aangezien zij van vrij direct belang zijn voor het ontwikkelen van een therapie.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het verkrijgen van meer inzicht in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan CMT-aaRS. Het uiteindelijke doel van dit onderzoek is bijdragen aan de ontwikkeling van evidence-based geneesmiddelen voor deze ongeneeslijke ziekte. De focus in dit project ligt op het achterhalen van de moleculaire mechanismen waarlangs

mutaties in tRNA synthetases leiden tot vermindering van eiwitsynthese en selectieve degeneratie van perifere motorische en sensorische neuronen. Middels overexpressie of toediening van specifieke tRNA wordt getracht de eiwitsynthese te herstellen tot normale niveaus, en het effect op het ontstaan of de ontwikkeling van neuropathie wordt gevolgd. Deze experimenten geven een indicatie van de bruikbaarheid van een dergelijke therapeutische aanpak voor de behandeling van (jonge) patiënten. Er is daarom binnen deze aanvraag een reële en vrij directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van de mechanismen waarlangs mutaties in enzymen betrokken bij eiwitsynthese leiden tot degeneratie van perifere motorische en sensorische neuronen nog beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën, en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers, de wetenschappelijke gemeenschap, de producent van [REDACTED] en de patiënten/samenleving. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast (zie C11 en C12). De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker en de betrokken organisaties zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis). Voor de wetenschappelijke gemeenschap is dit onderzoek van belang omdat het fundamentele kennis kan opleveren over het eiwitsynthese proces, hetgeen ook voor ander celbiologisch onderzoek van belang kan zijn. Voor de producent van [REDACTED] is dit onderzoek van belang omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van een geneesmiddel voor gebruik bij CMT patiënten. Dat zou een economisch voordeel kunnen opleveren voor deze [REDACTED]. Voor patiënten is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van een behandeling voor CMT. Op dit moment is er nog geen adequate behandeling van deze erfelijke ziekte die het dagelijks functioneren bemoeilijkt door voortschrijdende spierzwakte en het ontstaan van hamertenen, klompvoeten en/of klauwhanden. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan resulteren in een adequate behandeling van deze aandoening. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor CMT, is van groot belang voor de samenleving.
6. De aanvrager maakt geen melding van onbedoelde nadelige effecten op het milieu. Er is geen aanleiding voor de DEC om te verwachten dat die er zullen zijn.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager heeft zeer veel ervaring met de ex vivo analyses en met spierfunctie-onderzoek bij muizen. Eerder onderzoek heeft geresulteerd in tal van publicaties in

goede wetenschappelijke tijdschriften. De commissie is daarom overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde, onder andere op grond van een artikel 9 kwalificatie, om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.

8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan (zie C1 en C4). Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. Op verzoek van de commissie heeft de onderzoeker het mogelijke moleculaire werkingsmechanisme uiteen gezet, achtergrondinformatie aangaande subdoel 2 ingevoegd, en helder toegelicht waarom experimenten met zowel heterozygote als homozygote CMT-TyrRS muizen noodzakelijk zijn voor het bereiken van de doelstelling. De DEC is nu van mening dat het project navolgbaar goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. In de aanvraag wordt, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen afgeweken van de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU betreffende de huisvesting en verzorging van de dieren. De aanvrager geeft daarvoor de volgende reden(en): muizen met een stereotactisch geplaatste katheter, aangesloten op een subcutaan geïmplanteerde osmotische pomp, zullen tot vier weken individueel gehuisvest worden om te voorkomen dat de dieren elkaar verwonden en het implantaat kapot maken. De DEC is van mening dat de gegeven redenen voldoende onderbouwing hiervoor zijn. Het laag methionine dieet dat noodzakelijk is voor bepaalde metingen heeft geen invloed op het welzijn van de muizen.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door injecties, individuele huisvesting van dieren met een canule gedurende vier weken, de verschillende spiertesten, de EMG test onder anesthesie, en het doden onder anesthesie, hetgeen door de onderzoekers wordt ingeschat als licht ongerief. Een deel van de dieren ondergaat een stereotactische operatie om een katheter te plaatsen of een virale vector te injecteren, hetgeen door de onderzoekers wordt ingeschat als matig ongerief. De commissie zou het ongerief van enkele individuele experimentele procedures anders inschatten, maar is het wel eens met de inschatting van het cumulatief ongerief voor de dieren. Het cumulatieve ongerief is juist ingeschat als licht voor 71% van de dieren en matig voor 29% van de dieren.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven. Er zullen genetisch gemodificeerde dieren gebruikt

worden. Deze dieren hebben een milde aantasting van hun fenotype, die gemeten kan worden met specifieke functietesten en EMG. Deze aantasting van hun fenotype leidt echter niet tot afwijkend gedrag van de dieren gedurende de looptijd van de experimenten.

13. De onderzoekers verwachten dat ze geen humane eindpunten hoeven toe te passen bij de dieren in dit experiment. De commissie kan zich voorstellen dat er zich incidenteel toch omstandigheden zullen voordoen, bijvoorbeeld wanneer een dier onvoldoende herstelt na een stereotactische operatie, waarin het beter zou zijn om een humaan eindpunt toe te passen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderzoekers hebben eerst uitgebreid onderzoek verricht in cellen en fruitvliegmodellen voor CMT-aaRS. Daarmee is meer inzicht verkregen in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan deze erfelijke aandoening. Ook is duidelijk geworden dat eiwitsynthese verbeterd kan worden door overexpressie van relevante tRNAs. Een volgende noodzakelijke stap in de ontwikkeling van een behandeling voor mensen met deze aandoening zijn experimenten met muismodellen, aangezien zij de meest ziekte-relevante preklinische modellen zijn. Alleen zo kan worden bevestigd dat het moleculaire werkingsmechanisme in zoogdieren vergelijkbaar is, hetgeen directe aanknopingspunten biedt voor de ontwikkeling van behandelstrategieën.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten, wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De uitkomsten van de berekeningen voor het benodigde aantal dieren per proef kloppen soms niet, waardoor het gevraagde aantal dieren hoger is dan de juiste uitkomst van de berekening (bijvoorbeeld 56 dieren in plaats van 50 dieren voor experimenten 3 en 4). De commissie neemt aan dat deze vergissingen vanzelf aan het licht komen bij het overleg met de IvD voorafgaand aan de planning van de dierproeven.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De dieren worden verdoofd en ontvangen pijnstilling voor alle handelingen waarvoor dit vereist is. Wanneer dieren moeite hebben om de voerruif te bereiken zal het voedsel in de kooi worden gelegd. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek. De resultaten van de experimenten zullen mogelijk worden gebruikt voor het dossier dat noodzakelijk is voor medicijnontwikkeling.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: er zullen alleen mannelijke dieren gebruikt worden, omdat zij meer spiermassa hebben waardoor testuitslagen verschillen van vrouwelijke dieren. Aangezien we progressieve spieratrofie bestuderen is het cruciaal om muizen van hetzelfde

geslacht te gebruiken. Uit eerdere experimenten weten we dat de variatie in testuitslagen groter is bij vrouwtjes dan bij mannetjes. Bovendien maakt de keuze voor mannetjes de vergelijking met historische data mogelijk. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van meer inzicht in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan CMT-aaRS en het ontwikkelen van evidence-based geneesmiddelen voor deze ongeneeslijke ziekte het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte (voor 71% van de dieren) of matige aantasting van het welzijn en een aantasting van de integriteit van de proefdieren plaats. De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken (beschreven in C9 tot C20).
Voor patiënten is dit onderzoek op termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan de ontwikkeling van therapeutische strategieën die hun gezondheid en kwaliteit van leven kunnen verbeteren. CMT-aaRS is een erfelijke aandoening die milde klachten kan geven, maar ook kan leiden tot progressieve spierzwakte in onderarmen en -benen en verlies van gevoel in handen en voeten. Deze aandoening komt vrij vaak voor (1 op 2500 mensen), maar op dit moment is er nog geen effectieve behandeling. De resultaten van dit project zullen bijdragen aan meer kennis over de moleculaire mechanismen die leiden tot de aandoening, en de ontwikkeling van therapeutische strategieën die de ernst van de aandoening verminderen en/of het progressieve beloop zullen remmen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het nagestreefde inzicht in de moleculaire oorzaken van CMT-aaRS van substantieel en direct belang voor het ontwikkelen van een therapie.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: meer inzicht verkrijgen in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan CMT-aaRS. Het uiteindelijke doel daarvan is bij te dragen aan de ontwikkeling van therapeutische strategieën die de ernst van de aandoening verminderen en/of het progressieve beloop zullen remmen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De

aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat hij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

T.a.v. 10.2.e.eng

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1030020209867

Bijlagen

3

Datum 7 september 2020

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e.eng

Op 7 mei 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Rescue of CMT-aaRS mouse models by overexpression of cognate tRNA" met aanvraagnummer AVD1030020209867. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 7 september 2020 tot en met 1 juni 2025.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 30 juni 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 3 juli 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de anesthesiemethode, maatregelen omtrent het voorkomen van fokoverschotten, de humane eindpunten, de indeling van de bijlagen en de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

7 september 2020

Aanvraagnummer:

AVD1030020209867

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

7 september 2020

Aanvraagnummer:

AVD1030020209867

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 7 september 2020 tot en met 1 juni 2025, voor het project "Rescue of CMT-aaRS mouse models by overexpression of cognate tRNA" met aanvraagnummer AVD1030020209867, na advies van dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit .

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoofd afdeling Molecular Neurobiology; projectleader.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 7 mei 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 13 augustus 2020;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 13 augustus 2020;
 - c Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 30 juni 2020
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 13 augustus 2020.

Aanvraagnummer:

AVD1030020209867

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Rescue of CMT-TyrRS mouse models by overexpression of cognate tRNA			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / NCAT mice (Rosa26-STOP FLOX-GFP-2A-MetRS), ChaTcre/cre mice, YarsE196K/+ and YarsE196K/E196K mice, NFLcreER/creER mice, Camk2acre/cre mice, GFAPcre/cre mice, tRNATyr-high/+ and tRNATyr-low/+ mice, Rpl22HA/+ mice	2.091	100,0% Licht
3.4.4.2 Rescue of CMT-GlyRS mouse models by overexpression of cognate tRNA			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / NCAT mice (Rosa26-STOP FLOX-GFP-2A-MetRS), ChaTcre/cre mice, GarsC201R/+ mice, NFLcreER/creER mice	852	98,6% Matig 1,4% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD1030020209867

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:

AVD1030020209867

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Terugkoppeling CRO-voorwaarde

Periode waar terugkoppeling
betrekking op heeft: 1/1/2020 tm 31/12/2020

2015200

Naam instelling: Sovon vogelonderzoek
 Doelnummer: 25000
 Terugkoppeling betreft: AVD 250002015200

Titel project: Populatie dynamisch onderzoek aan

Titel Bijlage Dierproeven	Diersoort	Aantal	Ongerief	Titel studie	Terugkoppeling volgens de voorwaarde in de vergunning						In te vullen door de CCD		
					Terugkoppeling 1:	Terugkoppeling 2:	Terugkoppeling 3:	Terugkoppeling 4:	Terugkoppeling 5:	Terugkoppeling 6:	In Vergunning	Opmerkingen:	
3 4 4 1 Het met een zender/fogger uitrusten van vogels	59	164	3	Onderzoek naar effect van greppel plasdras in combinatie met een elektr sch raster op de	uitgerust met plakzender	vanellus vanellus							
3 4 4 1 Het met een zender/fogger uitrusten van vogels	59		3	Onderzoek naar dispersie en terrein gebruik van zeearenden in Nederland met spec lek	uitgerust met zender	Haliaeetus albicilla							
3 4 4 2 Het nemen van een bloed	59	85	3	Onderzoek naar het broedsucces van scholeksters (conditiemetingen en sexe	bloedprikken	Haematopus osteralegus							
4 4 1 H z / 00 v 0	59	98	3	Onderzoek naar drukfactoren voor gruttoeikens n Nederlands polderlandschap	uitgerust met zender	Limosa limosa							
3 4 4 1 Het met een zender/fogger	59	4	3	Onderzoek naar terrein gebruik en sterfteoorzaken van Buizerd in relatie tot gevoeligheid voor	uitgerust met zender	Buteo buteo							
4 4 1 v 0 z / 00 v	59	5	3	Onderzoek naar de trekroute en overwinteringsgebieden van in Nederland broedende bijeneters	uitgerust met geolocator met tuigje	Merops apiaster							
4 4 1 H z / 00 v 0	59	52	3	Onderzoek naar terrein gebruik en overlevingskansen van klutenkalkens in relatie tot	uitgerust met zenders	Recurvirostra avosetta							

Algemene opmerkingen:

In te vullen door de CCD
 Advies:

AVD 10.2.g 20171086 Chirurgische diermodellen - jaarlijkse terugkoppeling 2020

Vergunning geldend van 01-01-2018 t/m 31-12-2022

Voorwaarde: Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug ten behoeve voor 10.2.g dieren worden geopereerd en hoeveel dieren dat betreft, we k ongerief de dieren ondervinden, de hoofdljn van het doel, uitvalpercentages en aantallen 'in voorraad gedood'. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 15 maart door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken. Wanneer u overtuigend en onbetwistbaar kan aantonen dat er geen gegevens over de experimenten kunnen worden vrijgegeven omdat de opdrachtgever deze als vertrouwelijke informatie heeft geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden.

Type operatie	Ongerief	Aantal Muis vergunning	2018	2019	2020	Muis resterend
Canulaties + catheterisaties	3 = Matig	519	10.2.g	10.2.g	10.2.g	10.2.g
10.2.g	3 = Matig	1100				
10.2.g	3 = Matig	350				

Type operatie	Ongerief	Aantal Rat vergunning	2018	2019	2020	Rat resterend
Canulaties + catheterisaties	3 = Matig	3438	10.2.g	10.2.g	10.2.g	10.2.g
10.2.g	3 = Matig	1513				
10.2.g	3 = Matig	100				

Type operatie	Ongerief	Aantal Cavia vergunning	2018	2019	2020	Cavia resterend
Canulaties + catheterisaties	3 = Matig	250	10.2.g	10.2.g	10.2.g	10.2.g
10.2.g	3 = Matig	250				

Aantal dieren:

Diersoort	Type operatie	10.2.g	Doelcode	Ongerief	Geopereerd	Levend	Dood /uitval*	Gedood in voorraad*
muis	10.2.g		6	3	55	55	0	0
muis	10.2.g		20	3	68	68	0	0
muis	cannulatie		3	3	8	5	0	3
rat	cannulatie		84	3	8	8	0	0
rat	cannulatie		84	3	11	8	0	3
rat	10.2.g		26	3	20	18	0	2
rat	10.2.g		26	3	18	16	0	2
rat	cannulatie		84	3	10	8	0	2
rat	cannulatie		84	3	4	3	0	1
rat	cannulatie		84	3	4	4	0	0
rat	cannulatie		84	3	4	4	0	0
rat	cannulatie		95	3	18	15	0	3
rat	cannulatie		84	3	9	8	0	1
rat	cannulatie		84	3	4	4	0	0
rat	cannulatie		84	3	4	4	0	0
rat	cannulatie		84	3	4	4	0	0
rat	cannulatie		84	3	8	8	0	0
rat	cannulatie		84	3	9	8	0	0
rat	cannulatie		23	3	6	5	0	1
rat	cannulatie		20	3	33	30	0	3
rat	cannulatie		21	3	6	5	0	1
rat	cannulatie		84	3	4	4	0	0
rat	cannulatie		76	3	75	73	0	2
rat	cannulatie		21	3	7	7	0	0
rat	cannulatie		76	3	75	70	0	5
rat	cannulatie		84	3	4	4	0	0
rat	cannulatie		21	3	7	7	0	0
rat	cannulatie		84	3	4	4	0	0
rat	cannulatie		21	3	6	5	0	1

Totaal aantal dieren: 493 462 0 30

Percentage levend 94%

Uitvalspercentage: 0% 6%

* Alleen het aantal dieren dat is 10.2.g (de aantallen in de oranje kolommen), is conform het DEC- advies op deze vergunning geregistreerd.



> Retouradres Postbus 93118, 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproe
ven.nl

Datum 12 mei 2020
Onderwerp Dilemma gebruik proefdieren voor onderzoek naar verslavende middelen

Onze referentie

Inleiding

In de CCD vergadering van 31 januari 2020 is gesproken over het morele dilemma met betrekking tot proefdieronderzoek naar verslavende middelen. Dit naar aanleiding van een aanvraag gericht op (vermindering van) de effecten van GHB verslaving. Het gaat hierbij om de vraag in hoeverre er sprake is van 'eigen verantwoordelijkheid' bij het gebruik van verslavende middelen en of het wel gerechtvaardigd is om proefdieronderzoek uit te voeren om de gevolgen van het gebruik van dergelijke middelen te beperken. In de CCD vergadering is besloten een adviesvraag uit te zetten. Een afwegingskader zou wellicht kunnen helpen bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen over verslavende middelen. Op advies van de voorzitter van het NCad is besloten voor de adviesvraag contact op te nemen met het Centrum voor Ethiek en Gezondheid (CEG), een samenwerkingsverband tussen de Gezondheidsraad en de Raad voor Volksgezondheid en Samenleving.

Communicatie met CEG

De Algemeen Secretaris heeft vervolgens via de e-mail contact gehad met de secretaris van het CEG.

De Secretaris van het CEG gaf in zijn reactie het volgende aan "Ik heb even overlegd met de voorzitter van de CEG commissie, Maartje Schermer, en we komen tot de voorzichtige conclusie dat een bijdrage van het CEG in de vorm van een signalement (rapport) niet zo voor de hand ligt, omdat onze signalementen zich in principe richten op ethische vragen op het gebied van beleid (opgeroepen door ontwikkelingen op het gebied van gezondheid). De signalementen zijn vaak conceptueel van aard, en waarschijnlijk niet toegepast en specifiek genoeg voor een handelingskader, waar jullie behoefte aan hebben."

De Secretaris van het CEG geeft verder aan dat de vraag van de CCD raakt aan het thema van 'eigen verantwoordelijkheid voor gezondheid' waar het CEG al het een en ander over geschreven heeft. Hij verwijst voor ethische argumentatie naar de website van het CEG: <https://www.ceg.nl/ethische-dossiers/leefstijl>

Onderaan deze website staan drie links naar signaleringen die relevant zijn voor dit onderwerp, onder meer het signalement over leefstijldifferentiatie in de zorgverzekering.

Het CEG geeft tot slot aan het opmerkelijk te vinden dat overwogen wordt om geen dierproeven toe te staan bij een aandoening als verslaving, omdat die mede door eigen gedrag veroorzaakt zou worden: *"Dat vonden we opmerkelijk omdat er veel meer ziektes zijn die mede door eigen gedrag worden veroorzaakt of daardoor verergeren: obesitas, diabetes, longkanker, etc. Verslaving is nu eenmaal ook een ziekte, met erfelijke componenten en omgevingsfactoren, en bovendien is het een ziekte waar mensen en de samenleving ernstig onder lijden. In discussies over kosten wordt eigenlijk ook niet uitgegaan van eigen schuld; het lijden van mensen wordt belangrijk gevonden en schuld is relatief."*

Vervolg

Hoewel het CEG formeel geen advies heeft uitgebracht, is de reactie van het CEG helder. Het CEG beschouwt verslaving als een ziekte met erfelijke componenten en omgevingsfactoren waar mensen en de samenleving ernstig over lijden.

Uit verschillende websites blijkt dat ook instellingen die werkzaam zijn op het gebied van verslaving aan alcohol en drugs ervan uit gaan dat verslaving niet enkel eigen verantwoordelijkheid is. In de literatuur zijn hiervoor ook duidelijke aanwijzingen te vinden.

De volgende oorzaken voor verslaving worden genoemd:

- Soort drugs; afhankelijkheid treedt in verschillende mate op bij de verschillende middelen. Zo zijn heroïne en nicotine bij veel mensen al na enkele keren gebruiken verslavend, terwijl cannabis minder verslavend is.
- Genetische factoren; erfelijke factoren spelen waarschijnlijk voor 40-60% een rol bij de ontwikkeling van een verslaving. Welke genen precies een rol spelen is nog niet volledig duidelijk.
- Omgevingsfactoren; ook de omgeving en jeugd van een persoon speelt mee in de kans om een verslaving te ontwikkelen. Ook ingrijpende gebeurtenissen en stress kunnen een oorzaak zijn. Zo hebben jongeren met psychische problemen een grotere kans om verslaafd te raken en hebben kinderen waarbij een of beide ouders verslaafd zijn geweest meer kans op het ontwikkelen van een verslaving.

Het Secretariaat adviseert het bestuur op basis hiervan om verslaving (aan drugs) bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen niet te beschouwen als eigen verantwoordelijkheid, maar als een ziekte waar mensen aan lijden die (mede) veroorzaakt wordt door zowel genetische als omgevingsfactoren. Gezien bovenstaande is het Secretariaat van mening dat het niet gerechtvaardigd is om aanvragen gericht op verslaving bij de ethische afweging anders te behandelen dan aanvragen gericht op lichamelijk en mentale ziektes (door bijvoorbeeld het belang op voorhand als beperkt in te schatten).

Het Secretariaat adviseert tot slot geen adviesvraag uit te zetten over dit onderwerp en geen nader uitvoeringsbeleid te maken over aanvragen gericht op verslaving.



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Exposure to air pollutants (e.g., cigarette smoke, exhaust gases, microplastics, and organic and inorganic dusts) can contribute to the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or pulmonary

fibrosis [1]. These chronic diseases are characterized by irreversible changes in the lung architecture, thereby leading to a progressive loss of lung function. In COPD, persistent injury and dysregulated tissue repair result in airway inflammation, fibrosis around the airways, and loss of parenchymal tissue (emphysema) [2]. Pulmonary fibrosis is mainly characterized by the excessive deposition of extracellular matrix in parenchymal areas of the lung [3].

In healthy circumstances, extracellular matrix deposition after injury is regarded as an essential aspect of wound healing. Continuous lung injury and dysregulated wound healing, however, can result in loss of lung tissue or excessive deposition of extracellular matrix components and fibrosis. As currently available treatments only partially relieve symptoms, patients suffering from COPD or pulmonary fibrosis have a poor prognosis [2,3]. We therefore need more insight into the mechanisms of tissue repair to develop therapies aimed at lung regeneration, which may have the potential to restore lung function.

Lung tissue contains over 40 different cell types [4]. Epithelial cells are typically damaged first because they are a barrier between organs and the outside world and therefore play an important role in the pathogenesis of both COPD and lung fibrosis. For that reason, mechanisms of epithelial repair should be elucidated to identify molecular pathways that can be exploited to promote regeneration in diseased lung tissue. We have recently collected evidence of three cytokines being involved in lung epithelial repair:

1. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (**RANKL**). [10.2.g](#)
[REDACTED]
[REDACTED] Regeneration of type II alveolar epithelial cells is a crucial event during parenchymal lung tissue repair as these cells are the progenitors of type I epithelial cells that line the alveoli. This effect of RANKL has not been described before, and it is currently unknown which receptors and molecular pathways are responsible for this effect.
2. Macrophage migration inhibitory factor (**MIF**). MIF is one of the first cytokines that is being produced in response to lung tissue damage, and it was found to promote proliferation of type II alveolar epithelial cells. This effect could be induced through one of its receptors (CD74), although MIF can also signal through the following chemokine receptors: CXCR2, CXCR4, CXCR7, and epithelial growth factor receptor (EGFR)[5]. These receptors are expressed on different types of lung epithelial cells, and it is unknown whether MIF has pro-repair effects through other receptors and whether it affects other types of epithelial cells (e.g., bronchial epithelial cells).
3. D-dopachrome tautomerase (**DDT**). Due to its close relation to MIF, DDT is sometimes referred to as MIF-2. [10.2.g](#)
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] Unfortunately, there is no data available regarding the role of DDT in lung tissue, COPD, or pulmonary fibrosis.

Based on these observations we hypothesize that RANKL, MIF and DDT play a role in lung tissue repair by modulating epithelial repair, and that dysregulation of these factors contribute to the development of COPD and pulmonary fibrosis.

To test this hypothesis, we want to perform *in vitro* and *in vivo* experiments. First, we want to use lung organoids to investigate whether RANKL, MIF, and DDT stimulate proliferation and/or inhibit apoptosis of epithelial cells (**appendix 1**). Lung organoids are self-assembling three-dimensional structures generated from primary lung epithelial progenitor cells and CCL206 mesenchymal support cells (figure 1) [6]. Using lung organoids allows culture of primary type II alveolar epithelial cells, which is not possible in any other way. In addition, it reduces the use of laboratory animals as we can isolate numerous progenitor cells from a single mouse, thereby allowing us to investigate multiple experimental conditions

per animal. Exposing lung organoids to RANKL, MIF, and DDT could therefore provide us clues as to whether and how lung epithelial repair is affected.

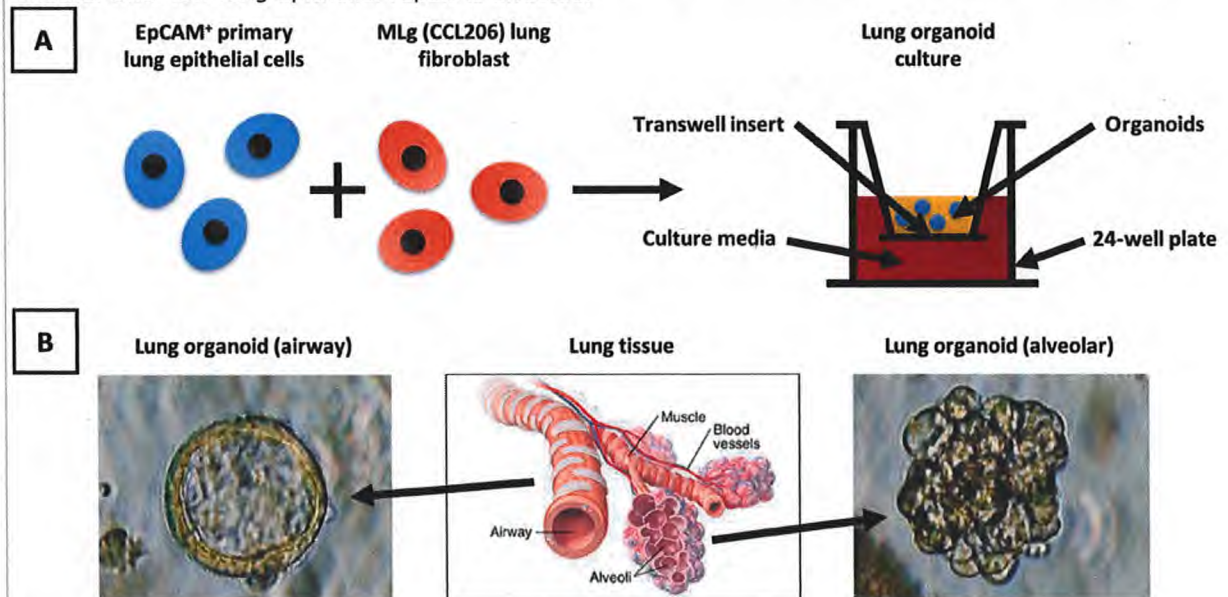


Figure 1. A) Lung organoids are prepared from primary lung epithelial cells that are co-cultured with lung fibroblasts. B) These isolated epithelial cells give rise to both airway and alveolar lung organoids.

Unfortunately, lung organoids do not recapitulate all of the complex structures that are present in the lungs. Therefore, upon discovering potentially therapeutic effects of RANKL, MIF, and/or DDT in lung organoids, we want to confirm these findings *in vivo*, using mouse models of COPD (induced by either cigarette-smoke or elastase) and pulmonary fibrosis (induced by either bleomycin or silica) (**appendix 2**). Two models per disease have been selected as both diseases are heterogenous with different phenotypes in patients, who may respond differently to the proposed therapies. Therefore, to improve the relevance and applicability of our findings, we want to use four models in total: model of smoke-induced lung injury resembling the bronchitis phenotype of COPD, model of elastase-induced lung injury resembling the emphysema phenotype of COPD, model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis resembling inflammation-dominant fibrosis, and model of silica-induced pulmonary fibrosis resembling non-inflammatory fibrosis. Taken together, this project aims to improve our understanding of epithelial repair in the lungs and to determine whether RANKL, MIF, and DDT can be used as potential treatments for COPD and pulmonary fibrosis.

References

1. Crosby, L. M. & Waters, C. M. Epithelial repair mechanisms in the lung. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* 298, L715–L731 (2010).
2. Rabe, K. F. et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 532–555 (2007).
3. Wilson, M. S. & Wynn, T. A. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol.* 2, 103–121 (2009).
4. Franks, T. J. et al. Resident Cellular Components of the Human Lung: Current Knowledge and Goals for Research on Cell Phenotyping and Function. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 5, 763–766 (2008).
5. Kang, I. & Bucala, R. The immunobiology of MIF: function, genetics and prospects for precision medicine. *Nat. Rev. Rheumatol.* 15, 427–437 (2019).
6. Barkauskas, C. E. et al. Lung organoids: current uses and future promise. *Development* 144, 986–997 (2017).

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The main objective of this project is to investigate the role of RANKL, MIF, and DDT in epithelial repair after lung tissue injury.

For that reason, we want to address the following 2 research questions:

1. Do RANKL, MIF, and DDT contribute to epithelial repair after lung injury?
2. Can RANKL, MIF, and DDT be used as treatments to promote tissue repair in models of disease?

To answer these questions, we need to further characterize effects in relevant *in vitro* and *in vivo* models. We expect a high feasibility of these studies because our preliminary data provides strong support for our hypothesis. Except for the elastase-induced COPD models, we have previously established all methods and models. Our laboratory has ample expertise with all techniques (e.g., organoid assay, smoke/bleomycin/silica mouse models, animal handling, and analyses of samples) to guarantee reliable outcomes. Furthermore, *in vivo* studies will only be performed after we have collected convincing results from our *in vitro* (organoid) studies.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

COPD and pulmonary fibrosis represent a huge clinical problem with extremely limited treatment opportunities; this project aims to identify and assess novel treatment strategies. More specifically, we want to elucidate the role of RANKL, MIF, and DDT in lung epithelial repair, and to determine whether these factors can be used to treat COPD or pulmonary fibrosis. In the Netherlands, there are over 300.000 patients suffering from either of these two conditions and this number is still increasing due to tobacco smoking and exposure to indoor/outdoor air pollutants. Up to this point, available treatments only (partially) relieve symptoms. As COPD and pulmonary fibrosis have a huge impact on the quality of life of patients and their life expectancy, we need to understand lung epithelial repair in greater detail to design novel epithelial repair-targeted therapeutic strategies.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

Part 1 (experiment described in appendix 1)

Do RANKL, MIF, and DDT contribute to epithelial repair after lung injury?

First of all, we want to acquire insights into whether and how RANKL, MIF, and DDT promote epithelial repair in lung organoids. For instance, do these proteins contribute to epithelial repair by promoting proliferation of epithelial cells? Or do they (also) inhibit epithelial cell death? To that end, we will use lung organoids to determine whether and how RANKL, MIF, and DDT affect epithelial repair. However, the preparation of lung organoids does require fresh primary lung epithelial cells, which will be isolated from naïve mice. Lung organoids will be subsequently cultured with RANKL, MIF, and DDT as well as small-molecule inhibitors of relevant molecular pathways or small interfering RNA (siRNA). siRNA is a valuable tool in functional genomics because it can be used to knockdown virtually any protein, thereby allowing scientists to deduce the role of proteins based on observed phenotypic changes. We can therefore use siRNA as an alternative to genetic knockout models, which are often difficult and laborious to generate. If RANKL, MIF, and/or DDT exert therapeutic effects in lung organoids (i.e., they promote epithelial repair upon injury), we want to continue with *in vivo* studies to determine whether these factors can be used as a treatment for COPD and pulmonary fibrosis.

Part 2 (experiments described in appendix 2)

Can RANKL, MIF, and DDT be used as treatments to promote tissue repair in disease models?

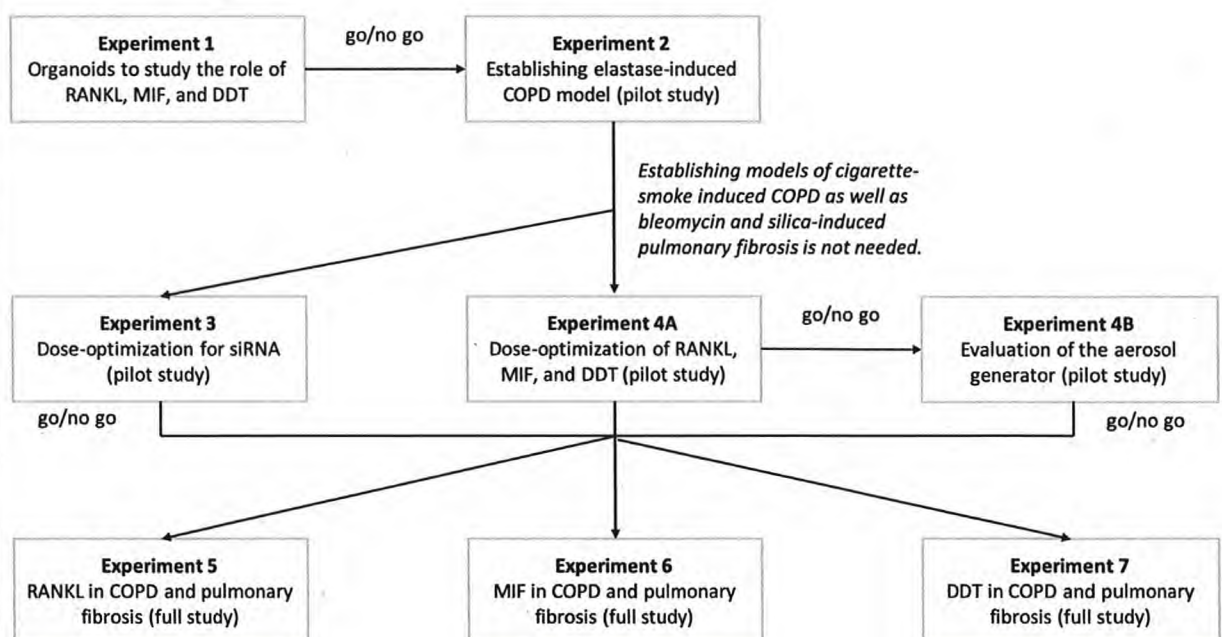
If RANKL, MIF, and DDT are shown to promote tissue repair in lung organoids, we want to assess whether these factors induce epithelial repair in mouse models of COPD (induced by either cigarette-smoke or elastase) and pulmonary fibrosis (induced by either bleomycin or silica). These models have been selected as both COPD and pulmonary fibrosis are heterogenous with different phenotypes in patients, who may respond differently to the proposed therapies. In these studies, we therefore focus on treatment with RANKL, MIF, and DDT, which will be administered via the pulmonary route formulated as solutions or dry powders. As an alternative to using genetic knockout models, we will also use siRNA *in vivo* to unravel whether knockdown of RANKL, MIF, and/or DDT impairs tissue repair in the lungs (knockouts are primarily used to understand the role of a specific gene or DNA region by comparing the knockout organism to a wildtype with a similar genetic background). Published studies have demonstrated that naked siRNA can be administered via the pulmonary route to induce knockdown of several proteins [1, 2]. siRNA can therefore be used as an alternative to genetic knockout models. We do not know, however, whether an altered lung architecture due to established COPD and pulmonary fibrosis affect the uptake and distribution of siRNA in the lungs. So we have to conduct a pilot study to optimize our siRNA dosing schedule.

References:

1. Ng, B. et al. Intratracheal Administration of siRNA Triggers mRNA Silencing in the Lung to Modulate T Cell Immune Response and Lung Inflammation. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 16, 194–205 (2019).
2. D'Alessandro-Gabazza, C. N. et al. Development and Preclinical Efficacy of Novel Transforming Growth Factor- β 1 Short Interfering RNAs for Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46, 397–406 (2012).

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

This project describes 7 experiments in total (see the diagram below). Each experiment has its own focus and involves the following procedures:



Experiment 1 (described in appendix 1). Here, we will isolate primary (EpCAM+) epithelial cells from naïve mice that can be used to prepare lung organoids. Our aim is to elucidate whether, and if so how, the previously described cytokines (i.e. RANKL, MIF, and DDT) contribute to epithelial repair. If clear effects are not demonstrated in a convincing manner, [REDACTED] studies will not be performed.

Experiment 2 (described in appendix 2). As we have not yet established the elastase-induced COPD model in our lab yet, we need to determine whether this model works as described in the literature. Establishing models of cigarette-smoke-induced COPD as well as bleomycin- and silica-induced pulmonary fibrosis is not needed because these models have been set up in our lab already.

Experiment 3 (described in appendix 2). This pilot experiment is performed to determine whether it is possible to achieve RANKL, MIF, or DDT knockdown in mice with COPD or pulmonary fibrosis and what the required siRNA dose would be. siRNA will be administered through intratracheal instillation. The knockdown efficiency of siRNA sequences will be first assessed *in vitro* to avoid unnecessary use of laboratory animals.

Experiment 4A (described in appendix 2). Because we want to determine whether RANKL, MIF, and DDT promote epithelial repair *in vivo*, we need to establish dose-response relationships in diseased mice. In this experiment, we will administer RANKL, MIF, and DDT as a solution via intratracheal instillation. The most optimal dose will be used in later experiments.

Experiment 4B (described in appendix 2). After optimizing the dose of RANKL, MIF, and DDT, we want to study whether these factors can be administered as a dry powder formulation (proteins are more stable in a dried state). 10.2.e.eng [REDACTED] [REDACTED]).

Experiment 5/6/7 (described in appendix 2). These experiments represent the full studies that aim to identify whether RANKL, MIF, and DDT can be used to treat COPD and pulmonary fibrosis. Depending on the outcomes of experiment 3, 4A, and 4B, groups may be excluded. For instance, if knockdown is not observed upon treatment with siRNA, we will not include siRNA groups in full studies.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

Part 1 (described in appendix 1)

First, we aim to characterize the effects of RANKL, MIF, and DDT in lung organoids (experiment 1). Using organoids, we collect a great deal of information whilst limiting animal use. If RANKL, MIF, and DDT are shown to induce epithelial repair, we can proceed with pilot *in vivo* studies. Depending on the protein, some *in vivo* studies may not be performed if effects are not convincingly demonstrated in organoids.

Part 2 (described in appendix 2)

Because we have no prior experience with the elastase-induced COPD model, we first need to determine whether this particular model works in our laboratory (experiment 2). The smoke, bleomycin, and silica models do not require this type of validation as we have successfully used these models in the past. This way, we limit the use of laboratory animals even further.

To optimize RANKL, MIF, DDT, and siRNA doses and to determine if dry powders can be used for delivery purposes, we need to conduct three pilot experiments (experiment 3, 4A, and 4B). Depending on the outcomes of these studies, certain conditions may be excluded from the full studies. siRNA groups, for example, will not be included if knockdown is not observed upon intratracheal administration of siRNA.

Finally, full studies will be conducted to assess the role of RANKL, MIF, and DDT in mouse models of COPD and pulmonary fibrosis (experiment 5, 6, and 7). As mentioned previously, some groups may be excluded if their inclusion cannot be justified. Please note, pilot studies and full studies will only be performed for proteins that were shown to promote epithelial repair in lung organoids.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	<i>Ex vivo</i> studies with mouse lung organoids
2	Mouse models of COPD and pulmonary fibrosis
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: intern [REDACTED] code 8151 / AVD^{10.2 e. en g} 202011285
2. Titel van het project: **Effects of RANKL, MIF, and DDT on epithelial repair in the lungs**
3. Titel van de NTS: **Effecten van RANKL, MIF en DDT op het herstel van longweefsel**
- 4.
5. Type aanvraag:
 - Nieuwe aanvraag projectvergunning**
6. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: [REDACTED]
 - telefoonnummer contactpersoon: ^{10.2 e. en g} [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon ^{10.2 e. en g} [REDACTED]
7. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **12-10-2020**
 - aanvraag compleet: **12-10-2020**
 - in vergadering besproken: **15-10-2020**
 - anderszins behandeld: **08-12-2020**
 - termijnonderbreking(en) van / tot **19-10-2020 tot 25-11-2020, 27-11-2020 tot 07-12-2020**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **25-11-2020, 07-12-2020**
 - advies aan CCD: **17-12-2020**
8. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.
9. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrek(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
10. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: **19-10-2020**
 - Gestelde vraag/vragen
 - 1/ M.b.t. het gebruik van het door u voorgestelde organoïde (deel 1): cruciaal in het gebruik van dit model is of de componenten in dit organoïde model (van slechts 2 celtypen) het proces van regeneratie van door COPD beschadigd longweefsel voldoende nabootst om de hypothese mee te kunnen aannemen of verwerpen. Naar mening van de DEC is een organoïde systeem zonder validatie

(zoals het onderhavige organoïde systeem) voor het optreden van en aantonen van moduleerbaarheid van het pathologische proces bij mens of dier per definitie niet een geschikt model om een onbekend pathologisch mechanisme mee op te lossen. Het is juist geschikt om drug screening mee te doen waarbij een beperkt functioneel effect de 'read-out' is. Op deze wijze is een organoïde systeem betekenisvol bij het reduceren van proefdiergebruik en wordt dit ingezet bij 'drug discovery' en 'drug development' processen. De DEC mist de bewijsvoering dat het gekozen organoïde model 'fit-for-use' is. Om dit aan te tonen zou het nodig zijn dat een onderzoeksfase wordt ingelast waarbij de aanvrager laat zien dat het gekozen systeem effecten van genoemde cytokines laat zien die (eventueel op een geselecteerd relevant moment ter bestudering van weefselherstel) onderzoeksresultaten tonen die congruent zijn met beschikbare informatie uit proeven bij mens of dier. De kans dat een onderzoeksvraag met een immunologische achtergrond opgelost kan worden met een organoïde systeem is zeer uitdagend omdat hierin een terugkoppelingssysteem van stimulatie-rijping-inhibitie met meerdere cellen tot de regulatoren behoort en als zodanig niet eenvoudig functioneel te verwezenlijken is in een robuust organoïde kweekstelsel.

- 2/ Er vanuit gaande dat (integriteit van) de epitheliale barrière c.q. epitheel regeneratie een centrale rol speelt in COPD, waarom zijn er dan zoveel diermodellen nodig? Kan niet eerst worden volstaan met één model?
- 3/U schrijft in uw onderzoeksvraag '*Can RANKL, MIF, and DDT be used as treatments to promote tissue repair in models of disease?*'. Het is hierbij niet helemaal duidelijk wat met 'treatments' wordt bedoeld. Zijn dat de cytokines zelf of kunnen dit bijvoorbeeld in dit project ook agonisten/antagonisten zijn?
- 4/ In de bijlage, onder B The animals, schrijft u: "*The choice of age is based on the ability of mice to show signs of lung epithelial repair upon injury*". Bovenstaande is een logische keuze voor het testen van medicatie die getest wordt op het bewerkstelligen van 'repair'. Echter in translationeel opzicht zou er ook een vergelijk gemaakt moeten worden met oudere muizen met een volledig ontwikkelde COPD, als het tenminste de bedoeling is om een toekomstig geneesmiddel toe te dienen aan patiënten met een ernstige graad van COPD. Dit laatste is niet noodzakelijk als gekozen wordt om medicatie te ontwikkelen voor patiënten met 'mild symptoms of COPD'. Een dergelijke beargumentering hoort dan bij de translationele poot van de studie.
- 5/ In aansluiting op de vorige vraag, in dit kader mist ook de motivatie van de voorgestelde route van toediening van de 'treatments' bij de *in vivo* experimenten. Als genoemde cytokines als zodanig worden gebruikt, is het naar mening van de DEC logisch om deze van de endotheliale kant te laten komen, omdat dit ook de route is die deze endogene stoffen van nature gebruiken. Kunt u uw motivatie geven voor de gekozen route van toediening (ook in het licht van toekomstig gebruik als therapeutisch middel c.q. als onderdeel van de translationele poot van het onderzoek)?
- 6/ Zowel de titel van het project als die van de NTS verschilt van de titels die zijn opgevoerd in het administratieve deel van de aanvraag (formulier aanvraag projectvergunning). Dat is verwarrend. Voorts geeft de titel van deelproject 2/bijlage 2 (Mouse models of COPD and pulmonary fibrosis) geen informatie over de experimenten die worden uitgevoerd met die muismodellen.
- 7/ In experiment 1 is de samenhang tussen vraagstelling en gekozen parameter voor de sample size niet duidelijk. De vraagstelling richt zich op de effecten van RANKL, MIF en DDT op o.a. het aantal organoïden, terwijl de sample size gebaseerd is op het effect van sigarettenrook op het aantal organoïden. In het verlengde daarvan, de ranges die in experiment 5-7 worden genoemd (groeps grootte 14 tot 18) lijken ook gebaseerd op de aannames in experiment 1 (dus effect van rook) terwijl in deze experimenten de outcome een parameter van therapeutisch effect zou moeten zijn. De vraag is dan ook voor deze experimenten, welke specifieke parameters zullen worden gebruikt om de sample size op te baseren (en is dus die globale inschatting van 14-18 per groep hier wel legitiem?).
- 8/ De beschrijving van de 3 V's in de bijlage(s) is wel erg summier (dat geldt overigens niet voor de NTS, waar een en ander meer wordt uitgewerkt dan in de aanvraag).
- 9/ Het gebruik van 10% extra dieren in de experimenten zou beter onderbouwd moeten worden.
- 10/ In bijlage 2, onder punt J, schrijft u: '*we expect a very low mortality rate for mice (< 1%)*.' Hoe wordt dit bedoeld (worden muizen dood gevonden in de kooien)? Dit is een wat vreemde opmerking in het licht van een correct toepassen van de humane eindpunten.
- 11/ Voor intratracheale toediening van farmaca zullen muizen –met onderliggende longpathologie– vaak inhalatie anesthesie krijgen. Deze herhaalde blootstelling aan een procedure met een anestheticum lijkt niet heel geschikt. Ook kan dit bij dragen aan het ongerief waardoor snel ernstig ongerief wordt bereikt. Wat is uw visie hierop?
- 12/ Bij het elastase model worden naïeve muizen op tijdstip 'week 0' gebruikt. Waarom is dit nodig? Wat is de onderbouwing hiervoor?

- 13/ Zijn er voor het opzetten van het elastase model voldoende dieren aangevraagd (er is namelijk een enkel experiment gepland)?
- 14/ In bijlage 2, onder J schrijft u: *'Changes in behavior and substantial weight loss (> 15%) indicates discomfort..'* Over welke tijdsspanne wordt het gewichtsverlies bepaald?
- 15/ In de NTS wordt de term 'minilong' gebezigd. Voor de DEC is deze term overtrokken omdat het gaat om eenvoudige organoïden gekweekt uit een (uit de muis geïsoleerde) EpCam+ cel en een muis fibroblast cellijn. De DEC verzoekt deze term te vervangen door een meer realistische.
- Datum antwoord: **25-11-2020**
- Verstrek(e) antwoord(en)
- 1/ De dierexperimentencommissie is correct in haar veronderstelling dat organoïden slechts beperkt in staat zijn om de complexe fysiologie van longweefsel na te bootsen. Desalniettemin kunnen organoïden gebruikt worden om processen te modelleren die betrokken zijn bij epitheelherstel en -regeneratie. Bovendien kunnen verschillende parameters geanalyseerd worden om te bepalen of RANKL, MIF en DDT herstel van longweefsel kunnen stimuleren (bijv. grootte, aantal en type van organoïden, mate van celdeling etc.).
Een ander voordeel van organoïden is dat ze ons in staat stellen om immunologische effecten – die beschreven zijn voor RANKL, MIF en DDT – te scheiden van mogelijke effecten op longherstel. Ook kunnen we met behulp van organoïden het aantal benodigde proefdieren sterk reduceren. Er kunnen immers een groot aantal experimentele condities op hetzelfde moment bestudeerd worden, gebruikmakende van weefsel van een enkel dier. Zodoende achten wij dit model 'fit-for-use'.
Als blijkt dat RANKL, MIF en/of DDT het herstel van longweefsel kunnen stimuleren in organoïden zullen wij het onderliggende mechanisme – en de therapeutische waarde van recombinant RANKL, MIF en DDT – verder onderzoeken in diermodellen zoals beschreven in Appendix 2. In deze complexere modellen zal ook aandacht worden besteed aan de immunologische effecten van RANKL, MIF en DDT.
- 2/ COPD en longfibrose zijn zeer ernstige ziekten waarbij de longen beschadigd raken. Voor zowel COPD als longfibrose geldt dat patiënten verschillende klinische kenmerken hebben. COPD kent bijvoorbeeld een vorm die gekenmerkt wordt door bronchitis (ontstekingen van de bronchiën) en een vorm die gekenmerkt wordt door emfyseem (destructie van longblaasjes). Longfibrose kan ook verschillend tot uiting komen. Zo bestaat er een vorm die gekenmerkt wordt door ontstekingsreacties en een vorm die dat niet heeft.
Vanuit een translationeel perspectief is het belangrijk om rekening te houden met deze verschillende vormen van COPD en longfibrose. Wij willen daarom gebruikmaken van verschillende modellen zodat onze resultaten breed toepasbaar zijn. Het zou bijvoorbeeld het geval kunnen zijn dat RANKL, MIF of DDT slechts binnen één diermodel therapeutische effecten kan bewerkstelligen (d.w.z. slechts één patiëntgroep zou mogelijk baat kunnen hebben bij een RANKL, MIF of DDT-gebaseerde therapie).
Zulke informatie is buitengewoon waardevol als men in de toekomst vervolgonderzoek middels klinische studies wil uitvoeren (m.b.t. selectie van patiënten). Uiteraard betekend dit niet dat we direct alle diermodellen gelijktijdig willen gebruiken. Om onnodig gebruik van (en ongerief bij) proefdieren tot een minimum te beperken willen we experimenten stapsgewijs uitvoeren, in eerste instantie gebruikmakende van één diermodel en één cytokine.
- 3/ Wij veronderstellen dat RANKL, MIF en DDT het herstel van longepitheel kunnen stimuleren. Vandaar dat wij recombinante eiwitten willen toedienen. Om verwarring te voorkomen hebben we de onderzoeksvraag veranderd naar "Can recombinant RANKL, MIF, and DDT stimulate tissue repair in disease models?". Wellicht dat in de toekomst, afhankelijk van werkingsmechanismen, agonisten en/of antagonisten ontwikkeld kunnen worden. Dergelijk onderzoek valt echter buiten de 'scope' van dit project. Nieuwe passage; "Research question 2: Can recombinant RANKL, MIF, and DDT stimulate tissue repair in disease models?"
- 4/ Zowel COPD als longfibrose zijn ziekten die vaak op latere leeftijd ontstaan. Wij delen daarom de opvatting dat het vanuit een translationeel perspectief interessant is om op termijn de werking van RANKL, MIF en/of DDT-gebaseerde therapieën te onderzoeken in oudere muizen. Zo kan men onderzoeken of dergelijke therapieën mogelijk gebruikt kunnen worden voor de behandeling van patiënten met een gevorderd ziektestadium. Echter, het doel van ons onderzoek is om te bestuderen óf – en zo ja, hoe – RANKL, MIF en DDT betrokken zijn bij het herstel van longepitheel. Hiervoor willen wij in de eerste instantie de omstandigheden optimaliseren om effecten te kunnen waarnemen, dat wil zeggen door muizen te gebruiken die nog grote mate van reparatie-capaciteit hebben. Vandaar dat wij binnen dit project niet kijken naar het effect van veroudering, dit kan echter wel onderwerp zijn van vervolgprijzen indien dit huidige project gunstige resultaten oplevert.
- 5/ Hier verschillen wij van mening met de dierexperimentencommissie. Concentraties van RANKL, MIF en DDT in longweefsel worden waarschijnlijk niet centraal gereguleerd via het bloed. Bovendien is het

these pilot studies we will not continue with animal studies. Unfortunately, there are no suitable alternative models that accurately reflect key aspects of COPD and pulmonary fibrosis. To properly demonstrate effects of RANKL, MIF, and DDT, we need to conduct animal studies.

- *Reduction: Before conducting experiments, we will always check the literature to avoid unnecessary duplication of experiments or investigating therapies that are proven not to be beneficial. We also apply appropriate power analyses to determine the required sample size. Data from pilot studies will be used to determine whether we can proceed with full studies. For instance, if the siRNA does not effectively reduce mRNA and protein levels, this group will not be included in full studies. We do, however, need to include internal controls for each experiment for practical reasons (see section B). In addition, the models of choice all reflect different aspects of COPD and fibrotic diseases, avoiding overlap and unnecessary animal use.*
- *Refinement: We will anaesthetize animals with isoflurane before the administration of elastase, bleomycin, silica, and pharmacological agents. Smoke-exposure will be gradually increased during the first few days to avoid acute toxic effects. The optimal doses of bleomycin, silica, and elastase have been already been established/published, thereby obviating the need for unnecessary dose-response studies. Finally, the use of multiple models that reflect different aspects of COPD and lung fibrosis increases the translational value of this research."*
- 9/ Wij verwachten 10% extra muizen nodig te hebben in verband met mogelijk mislukte epitheelcel-isolaties en/of contaminatie van organoïden (Appendix 1). Om te voorkomen dat er niet genoeg onafhankelijke samples zijn voor een adequate statistische analyse vragen wij het gebruik van extra muizen aan. Helaas ontbrak een soortgelijke argumentatie in Appendix 2. Wij hebben daarom een toelichting toegevoegd aan sectie B van Appendix 2. Nieuwe passage: *"To account for expected (1-5%; due to application of humane endpoints) and unexpected (~5%; due to sudden death or the spontaneous development of diseases other than COPD or pulmonary fibrosis) deaths of animals, we need 10% more animals. We also have to include internal control groups in each experiment for practical reasons: we cannot perform studies with hundreds of animals simultaneously."*
- 10/ Wij verontschuldigen ons voor de onduidelijkheid en begrijpen dat deze formulering vragen oproept. Wat wij eigenlijk bedoelden is dat, naar verwachting, 1 tot 5% van de dieren (afhankelijk van het ziektemodel) gedood zal moeten worden in verband met het bereiken van humane eindpunten. Vandaar dat we sectie J van Appendix 2 hebben aangepast om dit duidelijker te maken. Nieuwe passage: *"Based on our experience with smoke-induced COPD, silica-induced fibrosis, and what we understand from the literature about the elastase-model, we expect to euthanize < 1% of the animals due to the use of humane endpoints. Bleomycin-induced fibrosis, however, causes more severe disease. In this case, we expect to euthanize ~5% of the animals due to the application of humane endpoints."*
- 11/ Inhalatie-anesthesie heeft de voorkeur omdat andere anesthesievormen, zoals het gebruik van ketamine en xylazine, meer risico's met zich meebrengen (bijv. negatief effect op hart, nier- en leverfunctie). Een korte blootstelling aan inhalatie-anesthesie – in ons geval isofluraangas – veroorzaakt over het algemeen weinig tot geen schade en wordt goed verdragen door proefdieren. Ontwaken uit isofluraan-anesthesie verloopt meestal rustig en snel, wat herstel bespoedigt. Isofluraangas heeft daarom de voorkeur. Ons besluit om inhalatie-anesthesie te kiezen hangt ook samen met het feit dat we recombinant RANKL, MIF en DDT (en andere stoffen, zoals siRNA) pulmonaal willen toedienen. Orale toediening is bijvoorbeeld niet mogelijk in verband met degradatie van eiwitten in de maag. Parenterale toediening is ook niet ideaal omdat RANKL, MIF en DDT snel via de nieren kan worden uitgescheiden (vanwege hun gelimiteerde grootte). Dit zou als gevolg hebben dat de eiwitten zeer frequent moeten worden toegediend. Zeer frequente parenterale toediening van eiwitten zal ongetwijfeld snel ernstig ongerief veroorzaken. Vandaar dat pulmonale toediening van RANKL, MIF en DDT sterk de voorkeur heeft (naast de andere voordelen zoals omschreven in onze reactie op punt 5). Pulmonale toediening vereist overigens wel het gebruik van een anestheticum, waarvan isofluraangas het meest optimale is. In sectie H van Appendix 2 bespreken we nu uitvoeriger waarom we isofluraangas willen gebruiken. Nieuwe passage: *"Isoflurane anaesthesia will be used for pulmonary administration of elastase, bleomycin, and silica as well as of pharmacological agents (as solutions and as dry powders). In comparison to other types of anaesthesia (e.g., parenteral administration of ketamine and xylazine), the use of isoflurane is considerably safer (lower chances of cardiac depression) and less invasive (no injections). Isoflurane has a quick onset of effects and animals recover rapidly after halting isoflurane exposure. Analgesics will not be used throughout the experiment as the induction of COPD and pulmonary fibrosis do not cause pain that can be treated with analgesics. Furthermore, the use of analgesics may affect the functioning of the immune system, which is involved to a great extent in the development of COPD and pulmonary fibrosis."*
- 12/ Wij hebben de opzet van dit experiment aangepast (zie sectie B van Appendix 2). Het is de bedoeling om een groep onbehandelde muizen mee te nemen in het experiment die op hetzelfde tijdstip worden gedood als de muizen in de andere twee groepen (vehicle-groep en elastase-groep). Het gebruik van onbehandelde muizen is nodig om uit te kunnen sluiten dat het vehicle een effect heeft op het ontstaan van COPD met emfyseem. Nieuwe passage:

#	State	Treatment	Sacrifice	Discomfort
1	Healthy	Untreated mice	Week 3	Mild

2	Healthy	Vehicle-control	Week 3	Mild
3	Diseased	Elastase-treatment	Week 3	Moderate

- 13/ Het gebruik van elastase om COPD (met het emfyseem-fenotype) te induceren is veelvuldig omschreven in de wetenschappelijke literatuur. Wij hebben daarom aan de hand van gepubliceerde studies ons experiment opgezet (zie Appendix 2).
- 14/ Wij bedoelen in dit geval een gewichtsverlies van meer dan 15% ten opzichte van dag 0 (d.w.z. start van het experiment). Deze informatie ontbrak, maar is nu omschreven in sectie J van Appendix 2. Nieuwe passage: *"Throughout experiments, animals will develop either COPD or pulmonary fibrosis, meaning that we will carefully monitor the animals for signs of severe discomfort. The overall well-being of animals will be scored based on changes in weight, breathing, posture, behavior, coat, and alertness. Mice will be weighed and assessed prior to treatment, and five times per week for the remainder of the experiment. Changes in behavior and substantial weight loss (> 15% in comparison to day 0) indicates discomfort, meaning that we will prematurely euthanize the animal to avoid further pain, suffering, and/or fear."*
- 15/ Wij hebben de term 'minilong' veranderd naar 'organoïden'; met daarbij een korte toelichting dat organoïden in ons geval mini-luchtwegen en mini-longblaasjes betreft (zie sectie 3 en 4 van de NTS). Nieuwe passage: *"Hiervoor willen we gebruikmaken van organoïden (mini-luchtwegen en mini-longblaasjes gemaakt uit een bepaalde soort stamcellen) en diermodellen."*

Vervolg vraag (27-11-2020):

1/ De DEC heeft uw revisie en antwoorden op de vragen geëvalueerd. De veranderingen die zijn doorgevoerd n.a.v. vraag 2 en daarop volgende vragen zijn naar mening van de DEC bevredigend en ook voldoende beredeneerd. Echter, de motivatie waarom u het stuk wat correspondeert met vraag 1 wil houden zoals het is, vindt de DEC onbevredigend en wetenschappelijk niet verdedigbaar. U schrijft n.a.v. vraag 1: *'Desalniettemin kunnen organoïden gebruikt worden om processen te modeleren die betrokken zijn bij epitheelherstel en -regeneratie.'* Dit is geen valide redenering. Het gebruik van een organoïde systeem zonder validatie is naar mening van de DEC niet geschikt om het optreden van/aantonen van moduleerbaarheid van een pathologische proces bij mens of dier mee op te lossen. Het gebruik van een niet gevalideerd organoïde is als een vergelijking van onbekenden waaraan nog extra onbekenden toegevoegd worden, waarna het in een ander (*in vivo*) model verder onderzocht zal worden. Naar mening van de DEC schiet dat niet op bij het oplossen van het probleem. Verder schrijft u: *'Ook kunnen we met behulp van organoïden het aantal benodigde proefdieren sterk reduceren.'* Reductie van proefdieren is belangrijk, maar het is de DEC hier niet te doen om reductie van het aantal dierproeven opgenomen te krijgen in de aanvraag (of daar naar toe te redeneren). De DEC acht het belangrijker dat een onderzoek inzichten oplevert waarmee men verder kan (en mogelijk als gevolg hiervan er in de toekomst minder proefdieren gebruikt kunnen worden), dan dat de aanvrager zich in een stelling wringt die wetenschappelijk niet te verdedigen is. De DEC zou dan voorstellen om het organoïde model en het diermodel niet sequentieel gebruikt maar parallel /overlappend want er spelen zich verschillende en -in beiden- incomplete vormen af van de pathofysiologie in de mens. Het is dus wetenschappelijk meer verantwoord om deze twee modellen parallel te gebruiken en dan voor lief te nemen dat dit in de huidige proefopzet niet tot proefdierreductie leidt. In dit geval zou het onderzoek niet translationeel zijn, maar fundamenteel. Kunt u op bovenstaande reageren?

Antwoord (07-12-2020):

1/ Wij sturen u hierbij de gewijzigde documenten van onze aanvraag, rekening houdende met het voorstel van de dierexperimentencommissie over het gebruik van organoïden. We hopen dat de wijzigingen naar tevredenheid van de dierexperimentencommissie zijn doorgevoerd.

11. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar

discussie over geweest is.

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

Ja.

2. De aanvraag betreft **een nieuwe aanvraag**.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja.**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **n.v.t.**

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag past bij voorbeeld 4b van de handreiking invulling definitie project.

Chronische schade aan epitheelcellen speelt een belangrijke rol in de pathogenese van zowel COPD als longfibrose. Het doel van het project is het ontrafelen van mechanismen die betrokken zijn bij longepitheel herstel, dit om regeneratie van ziek longweefsel te kunnen bevorderen. De aanvragers hebben recent betrokkenheid van drie cytokines bij longepitheel herstel gevonden (RANKL, MIF en DDT). Verondersteld wordt dat ontregeling van deze factoren bijdraagt aan de ontwikkeling van COPD en longfibrose. Om deze hypothese te testen willen de aanvragers *in vitro* en *in vivo* experimenten uitvoeren. In *in vitro* experimenten met long organoïden zal het mechanisme van epitheliaal herstel (e.g. epitheelcelproliferatie, remming apoptose) onderzocht worden, met focus op de rol van RANKL, MIF en DDT hierbij. Omdat long organoïden niet alle complexe structuren vertegenwoordigen die in de longen aanwezig zijn zullen de effecten van RANKL, MIF en/of DDT ook in *in vivo* muismodellen van COPD (geïnduceerd door ofwel sigarettenrook ofwel elastase) en longfibrose (geïnduceerd door ofwel bleomycine ofwel silica) onderzocht worden (bijlage 2). Bovenstaande zal in parallel onderzocht worden.

De hierboven beschreven delen vormen een complementair en coherent geheel. In de aanvraag zijn de handelingen en het ongerief voor individuele dieren, en ook de uitkomstparameters duidelijk beschreven. De DEC is op grond van bovenstaande van mening dat dit project toetsbaar is.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

Voor zover de DEC 02-0000 kan beoordelen is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die uitvoering van het project/deze wijziging in de weg kan staan.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën)

aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

Het project wordt naar mening van de DEC^{10.2.0.000} terecht als fundamenteel gekarakteriseerd. Het fundamentele aspect van het project bestaat uit het ontrafelen van mechanismen die betrokken zijn bij weefselherstel in COPD en longfibrose, met focus op de effecten van RANKL, MIF en DDT op long epitheel regeneratie.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel is het ontrafelen van mechanismen die betrokken zijn bij weefselherstel in COPD en longfibrose, met focus op de effecten van RANKL, MIF en DDT op long epitheel regeneratie.

Het uiteindelijke doel is om nieuwe behandelingsstrategieën te identificeren die ingezet zouden kunnen worden bij de behandeling van COPD en long fibrose.

Er is deels een relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. De onderzochte cytokines zouden mogelijk onderdeel kunnen zijn van een toekomstige behandeling voor COPD en/of long fibrose. Naar mening van de DEC is het directe doel ook zeker gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoek zijn de proefdieren, onderzoekers en de samenleving.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast door verdoving, blootstelling aan sigarettenrook, toediening van elastase, bleomycine, silica of fysiologische zoutoplossing (intratracheaal), toediening van cytokines of siRNA (intranasaal of pulmonaal) en opoffering.

De dieren zullen hiervan stress ondervinden en terminaal of licht tot maximaal matig cumulatief ongerief ondergaan.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: vergroting van kennis van mechanismen die betrokken zijn bij weefselherstel in COPD en longfibrose, met focus op de effecten van RANKL, MIF en DDT op long epitheel regeneratie.

Waarden die voor de samenleving bevorderd worden: de uitkomsten van het project kunnen op termijn mogelijk bijdragen aan nieuwe behandelingsstrategieën bij COPD en long fibrose.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Er zijn in deze aanvraag geen aanwijzingen die aanleiding geven om effecten op het milieu te verwachten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

De DEC-^{102.0.009} is bekend met de ruime ervaring van de aanvragers op dit onderzoeksgebied. De aanvragers hebben hier ook over gepubliceerd in tijdschriften zoals o.a. The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Respiratory Research. Naar mening van de DEC is hiermee de kennis en kunde van de aanvrager voldoende gewaarborgd.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

Het project is onderverdeeld in twee complementaire delen die in parallel zullen worden bewerkt (zie ook C1). In een *in vitro* organoid model zal bepaald worden hoe RANKL, MIF en DDT effect hebben op epitheliale reparatie. Hierbij kan het mechanisme ook (meer uitgebreid) bestudeerd worden door inzet van remmers van relevante moleculaire pathways en/of siRNA. Gelijkijdig met de organoid experimenten wordt onderzocht of RANKL, MIF en DDT *in vivo* (epitheel)weefselherstel stimuleren. Dit wordt onderzocht middels toediening van de cytokines en siRNA inhibitie experimenten. Voor het *in vivo* deel zullen eerst pilot experimenten worden uitgevoerd alvorens de volledige experimenten worden gestart. Pilot experimenten worden gedaan ten behoeve van: het opzetten van het elastase model (de andere modellen zijn reeds operationeel), siRNA /cytokine dosis optimalisatie en evaluatie van pulmonale toediening middels een aerosol generator. Indien succesvol (go no-go moment) wordt overgegaan naar het volledige experiment. Er worden verschillende COPD en longfibrose modellen onderzocht (zie punt C1). De rationale hiervoor is dat het fenotype van COPD en longfibrose in patiënten heterogeen is en dat het van belang is om na te gaan hoe de verschillende fenotypen reageren op de interventies. Voor beide delen zijn de uitkomstparameters duidelijk en deze sluiten aan bij de doelstelling van het project. De DEC-^{102.0.009} is op grond van bovenstaande van mening dat het project goed is opgezet en dat de experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling

Welzijn dieren


9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde

beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **N.v.t.**

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De aanvrager heeft aangegeven dat verzorging en huisvesting van de dieren conform de richtlijn zullen zijn. Uit de aanvraag komen ook geen wetenschappelijke redenen naar voren die aanleiding zouden kunnen geven om hier van af te wijken.


11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

In de bijlages (bijlage 1; onder K, en bijlage 2 in tabellen; onder B en onder K) geeft de aanvrager, per deel, voor elke behandeling duidelijk weer wat het ongerief zal zijn. Ook wordt vermeld wat de verwachte duur en frequentie van de behandeling zal zijn. Hiermee wordt het cumulatieve ongerief -maximaal matig - realistisch ingeschat. Naar mening van de DEC- is op grond van bovenstaande het cumulatieve ongerief realistisch ingeschat.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De integriteit van de dieren wordt aangetast door verdoving, blootstelling aan sigarettenrook, toediening van elastase, bleomycine, silica of fysiologische zoutoplossing (intratracheaal), toediening van cytokines of siRNA (intranasaal of pulmonaal) en opoffering.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aanvrager geeft aan dat humane eindpunten kunnen ontstaan voor dieren die COPD of long fibrose ontwikkelen. Het welzijn van de dieren zal worden gescoord op basis van veranderingen in gewicht, ademhaling, houding, gedrag, vacht en alertheid. Muizen zullen worden gewogen en beoordeeld voorafgaand aan de behandeling, en vijf keer per week voor de rest van het experiment. Veranderingen in gedrag en substantieel gewichtsverlies (> 15% in vergelijking met dag 0) zijn hierbij humane eindpunten. Op basis van eigen ervaring en de literatuur maakt de aanvrager de inschatting dat < 1% van de dieren met rook-geïnduceerde COPD, silica-geïnduceerde fibrose en het elastase-model de humane eindpunten bereiken. Voor de dieren met de Bleomycine-geïnduceerde fibrose zal dat ongeveer 5% van de dieren zijn. Op grond van bovenstaande is de DEC- van mening dat de humane eindpunten goed gedefinieerd

zijn.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aanvrager geeft aan dat epitheel regeneratie niet met traditionele celkweek na te bootsen is. Hiervoor is een (meer complexe) organoïde nodig. Deze kan alleen gekweekt worden met –uit de long geïsoleerde-Epcam+ cellen. Long organoïde studies met primaire epitheelcellen uit menselijk weefsel zijn in principe mogelijk. Echter, het weefsel is moeilijk verkrijgbaar en het genereert vaak resultaten met een relatief hoge variabiliteit, dit omdat het weefsel van de patiënt door verschillende ziekte-achtergronden en behandelingen wordt beïnvloed. Er zijn geen alternatieve modellen die de complexe interacties in longweefsel (met o.a. het immuunsysteem) *in vivo* kunnen nabootsen. Om de effecten van RANKL, MIF en DDT op COPD en long fibrose goed aan te tonen zijn levende dieren nodig. Naar mening van de DEC is de aanvrager hiermee aan dit punt voldoende tegemoetgekomen.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aanvrager geeft aan dat groepsgroottes gebaseerd zijn op eerdere ervaringen en power berekeningen. Voor elk deel is ook gedetailleerd, per experiment en in tabellen, aangegeven wat het test programma zal zijn qua condities (e.g. te testen cytokine/ inhibitor/ siRNA, COPD of long fibrose model). Door het gebruik van *in vitro* organoïden kunnen per dier veel condities getest worden. Door het includeren van (*in vivo*) pilot studies en go no-go momenten (zie C8) wordt er met zo min mogelijk dieren gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen.

De door de aanvrager aangedragen informatie geeft naar mening van de DEC een helder en realistisch beeld van het aantal te gebruiken dieren.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aanvrager geeft aan dat verfijning bijvoorbeeld bestaat uit de keuze voor organoïden, waardoor dieren niet blootgesteld hoeven te worden aan (meerdere) drugs/ inhibitors. Blootstelling aan rook zal ook geleidelijk opgevoerd worden waardoor er geen acute toxische effecten kunnen optreden. Naar mening van de DEC wordt hiermee aan dit punt voldoende tegemoetgekomen.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

N.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Dieren van beide geslachten zullen worden gebruikt.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De dieren zullen worden gedood in het kader van het project. Dit is nodig om weefsel te verzamelen voor verdere analyse. Dieren worden gedood middels verbloeding onder anesthesie. Er wordt dus een voor de diersoort passende dodingsmethode conform bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.v.t.**

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Naar de mening van de DEC-XXXXXXXXXX is dit het geval.

D. Ethische afweging

5. **Benoem de centrale morele vraag**

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project: **"Effects of RANKL, MIF, and DDT on epithelial repair in the lungs "** het terminale en licht tot matige ongerief, dat de proefdieren wordt aangedaan in het onderhavige project?

Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **Voor de betrokken dieren leiden deze proeven tot terminaal of licht tot maximaal matig ongerief. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren wordt aangetast door verdoving, blootstelling aan sigarettenrook, toediening van elastase, bleomycine, silica of fysiologische zoutoplossing (intratracheaal), toediening van cytokines of siRNA (intranasaal of pulmonaal) en opoffering.**

Algemeen: Vergroting van kennis m.b.t. mechanismen die betrokken zijn bij weefselherstel in COPD en longfibrose, met focus op de effecten van RANKL, MIF en DDT op long epitheel regeneratie. Deze kennis kan op termijn mogelijk bijdragen aan nieuwe behandelingsstrategieën bij COPD en long fibrose.

12. De DEC-^{02.2.013} is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de wetenschap in het bijzonder binnen het project **"Effects of RANKL, MIF, and DDT on epithelial repair in the lungs"** zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de dieren.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project leiden tot een relevante uitbreiding van wetenschappelijke kennis m.b.t. mechanismen die betrokken zijn bij weefselherstel in COPD en longfibrose, met focus op de effecten van RANKL, MIF en DDT op long epitheel regeneratie. Vandaar dat de DEC-^{02.2.013} het onderhavige onderzoek vanuit wetenschappelijk oogpunt van reëel belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden.

Bij deze aanvraag heeft de DEC gediscussieerd of en in hoeverre proeven met sigarettenrook nog te verantwoorden zijn (zie punt E3 hieronder). Verder is gediscussieerd over in hoeverre een (relatief primitief) organoïde het proces van regeneratie van door COPD beschadigd longweefsel voldoende nabootst. M.a.w. in hoeverre het geschikt is om, voorafgaand aan een in vivo experiment, een hypothese mee te kunnen aannemen of verwerpen. Naar mening van de DEC zou het organoïde model en het diermodel niet sequentieel gebruikt moeten worden maar parallel /overlappend want er spelen zich verschillende en -in beiden- incomplete vormen af van de pathofysiologie in de mens. Parallel gebruik van de twee modellen zou dan complementaire informatie kunnen opleveren. Verder is de vraag gesteld waarom alle modellen nodig zijn en waarom de cytokines niet via een andere route toegediend kunnen worden waarbij deze dan bijvoorbeeld vanaf de endotheliale kant de long betreden (dit is de route die deze endogene stoffen van nature gebruiken). Met de gereviseerde versie van de aanvraag heeft de aanvrager deze punten voldoende geadresseerd.

Beantwoord de centrale morele vraag.

Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

13. De DEC-^{02.2.013} beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project **"Effects of RANKL, MIF, and DDT on epithelial repair in the lungs"**, dat gericht is op het ontrafelen van mechanismen die betrokken zijn bij weefselherstel in COPD en longfibrose, de opoffering en het terminale of lichte tot matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project bevestigend.

Hoewel de DEC-^{02.2.013} de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het reële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-^{02.2.013} is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak zeer waarschijnlijk leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise om het voorgestelde werk goed uit te voeren.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-**[REDACTED]** is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-**[REDACTED]** is er ook van overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-**[REDACTED]** de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "**Effects of RANKL, MIF, and DDT on epithelial repair in the lungs**" als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-**[REDACTED]** derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is unaniem tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang maken deze proeven in principe verantwoord. Daarbij kan wel de vraag worden gesteld of en in hoeverre proeven met sigarettenrook nog te verantwoorden zijn. Is hier geen tegenstelling met het breed gedragen maatschappelijk streven naar een rookvrije samenleving? Zoals ook bij eerdere vergelijkbare projecten kan de rechtvaardiging worden gevonden in de gegevenheid dat er nog steeds tal van mensen zijn die een (mede) door rookgedrag veroorzaakte longziekte hebben. Ook deze personen verdienen een optimale behandeling. En daaruit vloeit voort dat ook wetenschappelijk onderzoek te rechtvaardigen is (mits ook wordt voldaan aan andere randvoorwaarden).



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2 .e. en g

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 7890789 info@zbo-
ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 10.2 .e. en g 202011285
Bijlagen
3

Datum 3 februari 2021
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 9 oktober 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Investigating factors that influence epithelial repair in lung tissue" met aanvraagnummer AVD 10.2 .e. en g 202011285. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 3 februari 2021 tot en met 1 november 2025.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 10.2 .e. en g (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 17 december 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.